

**Untersuchungen über die Schutzwirkung
einiger Radioprotektoren und Aminosäuren gegen
die chromosomenschädigende Aktivität chemischer
Mutagene in menschlichen Lymphocyten in vitro**

von

Dr. Erich Gebhart



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. med. G. Koch

**Untersuchungen über die Schutzwirkung
einiger Radioprotektoren und Aminosäuren gegen
die chromosomenschädigende Aktivität chemischer
Mutagene in menschlichen Lymphocyten in vitro**

Der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
als Habilitationsschrift

vorgelegt
von
Dr. Erich Gebhart

Aus dem Institut für Biologie und Anthropologie
der Universität zu Köln
Geleitet: Professor Dr. med. habil.
Dr. phil. habil. Dr. phil. habil.

Untersuchungen über die Schutzwirkung
einiger Radionuklide und Antikörper gegen
die chromosomenverändernde Aktivität chemischer
Mutagen in menschlichen Lymphozyten *in vitro*

von
Dr. phil. habil. Dr. phil. habil.
Dr. phil. habil. Dr. phil. habil.
Dr. phil. habil. Dr. phil. habil.
Dr. phil. habil. Dr. phil. habil.



Tag der Habilitation : 14. 11. 1972

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1)	Einleitung
2)	Material und Methodik
2.1)	Kulturansatz und Chromosomenpräparation
2.2)	Testsubstanzen und Applikation
2.3)	Zytogenetische Auswertung
2.4)	Quantitative Auswertung
3)	Ergebnisse
3.1)	Ergebnisse mit den Testsubstanzen
3.1.1)	Modell-Clastogene
3.1.1.1)	Myleran ^R (1,4-Dimethyl-sulfonyl-dihydroxybutan)
3.1.1.2)	Trenimon ^R (2,3,5-Tris-äthylenimino-benzochinon-1,4)
3.1.1.3)	8-Hydroxychinolinsulfat (8-HCHS)
3.1.2)	Test-Protektoren
3.1.2.1)	Radioprotektoren
3.1.2.2)	Aminosäuren
3.2)	Vorversuch: Die Protektorwirkung von L-Cystein gegen die clastogene Aktivität von Myleran ^R
3.3)	Screening-Untersuchungen mit verschiedenen potentiellen Protektoren
3.3.1)	Radioprotektoren
3.3.2)	Aminosäuren
3.4)	Dosis-Effekt-Beziehungen
3.4.1)	Trenimon ^R als Modell-Clastogen
3.4.1.1)	L-Cystein als Test-Protektor
3.4.1.2)	Cysteamin als Test-Protektor
3.4.1.3)	AET als Test-Protektor
3.4.1.4)	L-Asparagin und L-Methionin
3.4.2)	8-HCHS als Modell-Clastogen
3.4.2.1)	Vergleichende Dosis-Effekt-Untersuchungen mit den drei Radioprotektoren
3.4.2.2)	L-Asparagin

3.5)	Zeit-Effekt-Beziehungen	35
3.5.1)	Vorbehandlung mit dem Protektor	35
3.5.2)	Gleichzeitige Einwirkung von Protektor und Clastogen während verschiedener Zellzyklusphasen	36
3.5.2.1)	L-Cystein/Trenimon ^R	37
3.5.2.2)	AET/Trenimon ^R	38
3.5.2.3)	L-Methionin/Trenimon ^R	40
3.5.2.4)	L-Cystein/8-HCHS	41
3.5.3)	Nachbehandlung	42
3.5.3.1)	L-Cystein/Trenimon	42
3.5.3.2)	AET/Trenimon	42
3.5.3.3)	L-Cystein/8-HCHS	44
4)	Diskussion	45
4.1)	Auswahl der Testsubstanzen und Toxizität	45
4.2)	Protektoreffektivität	46
4.3)	Wirkungsmechanismen	52
4.4)	Schlußfolgerungen	56
5)	Zusammenfassung	58
6)	Literatur	60

1) EINLEITUNG

Die erbgutschädigende (= mutagene) Wirksamkeit verschiedener Chemikalien ist heute eine gesicherte Tatsache (vgl. Übersichten bei FISHBEIN et al. 1970; VOGEL u. RÖHRBORN 1970; HOLLAENDER 1971). Zu unseren Kenntnissen über die potentielle Gefährdung des menschlichen Erbgutes durch Chemikalien haben Untersuchungen an den verschiedensten experimentellen Testsystemen (z. B. Mikroorganismen, Pflanzen, Insekten, Kleinsäugetern) beigetragen. Die Einbeziehung von Chromosomenuntersuchungen an menschlichem Zellmaterial in die Mutageneseuntersuchungen hat diese Kenntnisse wesentlich bereichert (SHAW 1970).

Unter den als mutagen bzw. chromosomenschädigend (= clastogen) erkannten Chemikalien fanden sich immer wieder Substanzen, die vom Menschen direkt oder indirekt regelmäßig oder zeitweise in größeren Mengen inkorporiert werden, wie z. B. Wirkstoffe von Arzneimitteln und Pestiziden.

Die einzige praktikable Möglichkeit einer weitgehenden Ausschaltung oder doch zumindest Einschränkung der Gefahren, die dem menschlichen Erbgut im heutigen Zivilisationsmilieu drohen, wurde bislang in der Warnung vor der Verwendung potentiell mutagener Chemikalien gesehen. Als potentiell mutagen werden dabei alle chemischen Agentien bezeichnet, deren mutagene bzw. clastogene Wirksamkeit an mehreren, möglichst verschiedenen Testorganismen sicher nachgewiesen ist (vgl. DFG 1971; WHO 1971).

Ein genereller Verzicht auf potentielle Mutagene ist aber in den verschiedensten Anwendungsbereichen nicht immer möglich. Gerade auf dem Gebiet der Chemotherapie zeigt sich, daß bestimmte genetisch bedenklich erscheinende Substanzen bei entsprechender Indikation nach wie vor auch bei fortpflanzungsfähigen Patienten angewandt werden müssen, weil sie bislang noch nicht durch gleich wirksame, aber genetisch weniger bedenkliche ersetzt werden können. Hier erscheint die Suche nach geeigneten Schutzmöglichkeiten unerläßlich.

Schutzstoffe gegen die toxische, aber auch gegen die mutagene bzw. chromosomenschädigende Wirkung energiereicher Strahlen sind seit geraumer Zeit bekannt und wurden an den verschiedensten Testsystemen überprüft (vgl. BACQ 1965; RIEGER u. MICHAELIS 1967). Zu den bekanntesten dieser "Schutzstoffe" zählen die SH-Verbindungen L-Cystein und Cysteamin, aber auch Aminoäthylisothiuronium (AET).

Die Möglichkeiten einer Beeinflussung der chemischen Mutations- und Aberrationsauslösung mit Hilfe solcher Protektoren wurde bisher nur in relativ geringem Umfang untersucht (RIEGER u. MICHAELIS 1967). So konnte eine Protektorwirkung der Aminosäure L-Cystein bisher an pflanzlichen Organismen (AVANZI 1957, 1961; BONATI, SAVINO 1965, GEBHART 1968, KAUL 1969) und bei Drosophila (RÜHRBORN 1968) nachgewiesen werden. Über die Reduktion der spontanen und induzierten Mutationsrate bei Bakterien mit Hilfe einiger Polyamine berichteten JOHNSON und BACH (1965, 1966). Außerdem scheint die spontane Mutationsrate zur Azaguanin-Resistenz menschlicher Knochenmarkszellen (D-98) durch Quinacrinhydrochlorid vermindert zu werden (JOHNSON u. BACH 1969).

Systematische Untersuchungen über eine Einschränkung der chromosomenschädigenden Effektivität chemischer Mutagene an menschlichem Zellmaterial fehlen bislang aber völlig. Da aber gerade Modellversuche an diesem Testsystem Einblicke in die Möglichkeiten eines therapeutischen "Chemikalienschutzes" bieten könnten, wurde ein entsprechendes Testprogramm vorgeschlagen (GEBHART 1971). Danach sollten zunächst bekannte Radioprotektoren auf ihre Schutzwirkung gegenüber ausgewählten Modell-Clastogenen untersucht werden. In Hinblick auf eine spätere praktische Anwendung erschiene es wünschenswert, möglichst natürliche (und damit besser verträgliche) antimutagene Substanzen zu finden. Aus diesem Grund wurden zunächst auch einige Aminosäuren in die Untersuchungen aufgenommen (BARTHELMESS et al. 1968).

Als Testsystem für solche experimentelle Untersuchungen an menschlichem Zellmaterial erscheinen Lymphozytenkulturen aus dem peripheren Blut be-

sonders geeignet. Sie sind als Standard-Testsystem für Untersuchungen über die experimentelle Auslösung von Chromosomenaberrationen anerkannt. Zytogenetische Tests an menschlichen Lymphozytenkulturen haben zudem bislang wertvolle Beiträge sowohl zur Routineprüfung chemischer Agentien auf chromosomenschädigende Wirksamkeit als auch zur zytogenetischen Grundlagenforschung geliefert (vgl. GEBHART 1970).

Als wichtigstes Ergebnis einer Untersuchung an menschlichen Zellen über anticlastogene Wirkung war eine Antwort auf die Frage zu erwarten, ob es überhaupt eine Schutzwirkung gegenüber der chromosomenschädigenden Wirksamkeit chemischer Mutagene gibt. Die eingehende Analyse der zytogenetischen Wirkungsmechanismen sollte erste Hinweise auf die notwendige chemische Struktur effektiver Protektoren bzw. die Zusammensetzung von Protektorgemischen für die praktische Anwendung erbringen. Darüber hinaus waren auch wesentliche Erkenntnisse für die zytogenetische Grundlagenforschung vor allem hinsichtlich jener Faktoren zu erwarten, die einen entscheidenden Einfluß auf die chromosomenschädigende Effektivität chemischer Mutagene ausüben.

2) MATERIAL UND METHODIK

2.1) Kulturansatz und Chromosomenpräparation

Aus dem Armvenenblut von gesunden Probanden (Blutspendern!) wurden Lymphozytenkulturen nach der (etwas abgewandelten) Methode nach MOORHEAD et al. (1960) angesetzt. Jede Kultur enthielt 20 Tropfen Blut, 2ml Serum vom fötalen Kalb (Colorado Serum Company) und 6 ml penicillinhaltiges (500 IE/ml) Medium TC 199 (Gibco). Zur Stimulierung der Zellteilung wurden jeder Kultur 0,2 ml Phytohämagglutinin (Wellcome) zugegeben. Die Kulturdauer betrug im allgemeinen 72 Stunden, in einigen Fällen (z. B. Langzeitversuche mit Myleran) auch 96 Stunden.

Nach der Behandlung der Zellen mit einer hypotonen Lösung (Na-Citrat 0,5 %, 20 min. bei 37°C) wurde in Äthanol-Eisessig (4 : 1) fixiert. Auch die Herstellung luftgetrockneter Chromosomenpräparate erfolgte nach der üblichen Methode (MOORHEAD et al. 1960). Die Färbung der Chromosomen erfolgte mit Aceto-Orcein, die Einbettung zu Dauerpräparaten unter Verwendung von Eukitt.

2.2) Testsubstanzen und Applikation

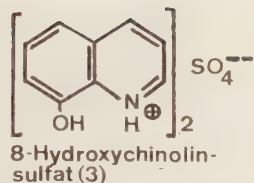
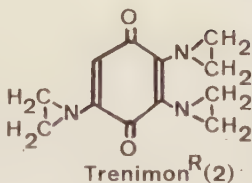
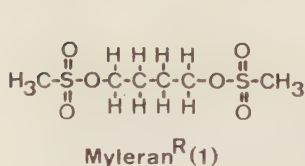
Die verwendeten Testsubstanzen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Abgesehen von Myleran (Lösungsmittel: fötales Kälberserum) wurden alle Substanzen in Aqua bidest. gelöst und in den bei den einzelnen Versuchen angegebenen Endkonzentrationen den Kulturen zugesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Ausgangslösungen so hoch konzentriert waren, daß nur geringe Lösungsmengen (bis max. 0,4 ml) in die Kultur eingebracht werden mußten. Die parallel angesetzten Kontrollkulturen wurden jeweils mit der gleichen Menge Lösungsmittel versetzt. Die Behandlungszeit betrug bei den Vorversuchen (Screening-Tests) und den Dosis-Effekt-Versuchen im allgemeinen 24 Stunden (Ausnahmen sind bei den jeweiligen Tests angegeben). Bei den sog. Zeit-Tests zur Ermittlung der Zellzyklusspezifität wurde eine Stunde behandelt, zwischen der Agenseinwirkung und der Fixierung lagen verschieden lange "Erholungszeiten".

2.3) Zytogenetische Auswertung

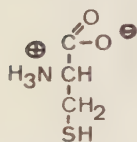
Für jede Versuchsstufe wurden nach Möglichkeit 100 gut analysierbare Metaphaseplatten aus mindestens zwei verschiedenen Versuchsansätzen bei ca. 1500facher Vergrößerung lichtmikroskopisch ausgewertet. Bei der zytogenetischen Analyse wurden in erster Linie die chromosomalen Strukturdefekte erfaßt, daneben auch Polyploidisierung. In Einzelfällen, in denen dies notwendig erschien, wurde auch der Mitoseindex bestimmt.

Tabelle 1: Testsubstanzen

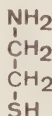
Modell-Clastogene



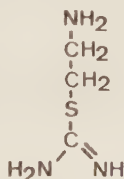
Radioprotektoren



L-Cystein (4)

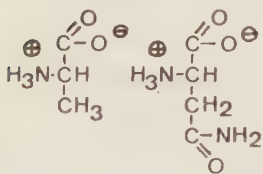


Cysteamin
(4)

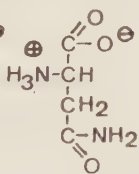


β-Aminoäthyl-
isothiuronium (5)
(AET)

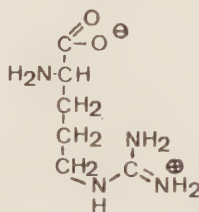
Aminosäuren (4)



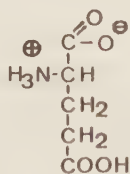
L-Alanin



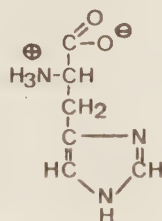
L-Asparagin



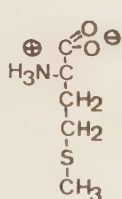
L-Arginin



L-Glutamin-
säure



L-Histidin



L-Methionin

Herkunft der Testsubstanzen:

(1) = Burroughs Wellcome & Co., London

(2) = BAYER, Leverkusen

(3) u. (4) = Merck, Darmstadt

(5) = Schuchardt, München

* = Als L-Cysteiniumchlorid

** = Als Cysteaminiumchlorid

*** = Als Aminoäthylisothiuroniumbromidhydrobromid

Nach den früher zusammengestellten Kriterien (GEBHART 1970) wurden folgende chromosomale Aberrationstypen unterschieden (siehe Abb. 1):

- (1) Lokale Achromasien (= achromatische Lücken; Gaps). Sie betreffen meist eine ("Chromatid-Gaps"), nicht selten auch beide Chromatiden im gleichen Bereich ("Isochromatid-Gaps"). Es handelt sich dabei um ungefärbte Lücken in der Chromatidstruktur, die keine echte Diskontinuität der Chromatiden darstellen (vgl. Abb. 1a, b).
- (2) Brüche. Auch sie betreffen eine ("Chromatid-Brüche") oder beide Chromatiden im gleichen Bereich ("Isochromatid-Brüche"). In beiden Fällen ist die Chromatidstruktur eindeutig unterbrochen, die azentrischen Bruchstücke sind meist mehr oder weniger deutlich disloziert (vgl. Abb. 1 c, d).
- (3) Austausch-Folgen (Translokationen). Zu dieser Defekt-Gruppe gehören die Translokationskreuze, -triradiale und -komplexe, die Resultate von Stückaustausch auf chromatidaler Basis (Abb. 1 e), sowie die Folgen von Austausch auf chromosomaler (= präreplikativer) Basis, wie dizentrische Chromosomen (Abb. 1 f) und Ringchromosomen. Atypische Chromosomen (Abb. 1 g), die ebenfalls als Ergebnis chromosomaler Translokationsereignisse zu verstehen sind, lassen sich ohne Erstellung der Karyogramme für jede einzelne ausgewertete Metaphase nur unvollständig erfassen. Wegen ihres relativ seltenen Auftretens wurden chromatidale und chromosomale Austauschfolgen in den Tabellen und graphischen Darstellungen dieser Arbeit zusammengefaßt (Exchanges E).

2.4) Quantitative Auswertung

Das Ausmaß des Protektoreffektes wurde jeweils als sog. Reduktionsfaktor (RF) dargestellt. Dieser Reduktionsfaktor stellt den Quotienten aus dem jeweiligen Aberrationswert unter dem Einfluß von Clasto-



Abb. 1: Aberrationstypen

a) Chromatid-Gaps; b) Isochromatid-Gaps; c) Chromatid-Brüche;
d) Isochromatid-Brüche und azentrische Fragmente; e) Chromatid-
Translokationen; f + g) Chromosomentranslokationen: Dizentrische
Chromosomen (f) und atypische Chromosomen (g). (Bei den atypi-
schen Chromosomen sind zum Vergleich Normalchromosomen des
gleichen Chromosomensatzes (n) abgebildet).

gen und Protektor und dem Aberrationswert unter dem Einfluß des Clastogens allein dar. RF-Werte unter 0,75 wurden als Indikator für einen deutlichen Protektoreffekt des untersuchten Agens gewertet. Um auch die Schwankungsbreite aus verschiedenen Tests in die Aussage miteinzubeziehen, wurden die Unterschiede zwischen den Aberrationsraten nach Protektoreinwirkung und den durch die Clastogeneinwirkung allein induzierten mit dem t-Test auf Signifikanz geprüft. Bei gleicher Tendenz aller Aberrationstypen erschien die Annahme einer potentiellen Protektorwirkung bei $P < 0,1$ bzw. einer eindeutigen Protektorwirkung bei $P < 0,05$ gerechtfertigt.

3) ERGEBNISSE

3.1) Ergebnisse mit den Testsubstanzen

3.1.1) Modell-Clastogene

3.1.1.1) Myleran^R (1,4-Dimethyl-sulfonyl-dihydroxybutan)

Die aberrationsauslösende (clastogene) Wirkung des bifunktionellen alkylierenden Agens Myleran an menschlichen Lymphozytenchromosomen wurde durch umfangreiche Test gesichert (GEBHART 1969).

Dabei wurden besonders häufig Aberrationen vom Achromasie- (Gap-) Typ und vom Bruch-Typ nachgewiesen. Chromatidale und chromosomale Austauschfolgen waren demgegenüber relativ selten zu beobachten. Die auftretenden Defekte schienen nicht zufallsgemäß auf die Zellen verteilt zu sein. Die zytogenetische Wirkung des Agens war deutlich konzentrationsabhängig. Der erste Abschnitt der Interphase, die sog. G1-Phase, schien für die clastogene Aktivität des Myleran

besonders sensibel zu sein. Der Ablauf des Zellzyklus wird unter Myleran-Einwirkung deutlich verzögert. Die für die Betrachtungen zur Protektorwirkung wesentlichsten Ergebnisse mit Myleran sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Zytogenetische Befunde nach Einwirkung von Myleran ($2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) auf menschliche Lymphozytenchromosomen

Einwirk. (h)	6 ^x	12 ^x	18 ^x	24 ^x	36 ^x	48 ^x	Kontr. ^{xx}
Aberr. Metaph. (%)	17	20	34	43	65	84	4
Metaph. m. mehr. Defekten versch. Typs (%)	0	2	9	10	28	58	1
Chromatid-Gaps	2	8	36	26	68	86	2
Isochromatid-Gaps	0	2	13	19	36	67	1
Chromatid-Brüche	11	7	10	9	33	66	2
Isochromatid-Brüche	7	4	4	23	26	98	0
Austauschfolgen (Exchanges)	1	1	0	8	2	8	0
Gaps pro Metaph.	0,02	0,1	0,49	0,45	1,04	1,53	0,03
Bruchereign. pro Metaph.	0,2	0,15	0,15	0,42	0,65	1,78	0,02

x = jeweils aus 100 Metaphasen

xx = aus 300 Metaphasen (auf 100 bezogen)

3.1.1.2) Trenimon^R (2,3,5-Tris-äthylenimino-benzochinon-1,4)

In den hier untersuchten Konzentrationsbereichen induziert das trifunktionelle Äthyleniminderivat Trenimon zahlreiche chromosomale Strukturdefekte wie Chromatid- und Isochromatid-Gaps, Chromatid- und Isochromatid-Brüche, die zur Entstehung azentrischer Fragmente führen. Die Folgen chromatidaler Austauschereignisse (Translokationskreuze und -triradiale) waren relativ häufig zu beobachten, dizentrische und auffallende (= ohne Karyogrammanalyse erkennbare) atypische Chromosomen fanden sich dagegen sehr selten. Die erhaltenen Ergebnisse stimmen gut mit den Angaben von HAMPEL (1968) überein, die wesentlichsten sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3: Zyto-genetische Befunde nach Einwirkung von Trenimon auf menschliche Lymphocytenchromosomen.

a) Dosis-Effekt-Beziehungen (Trenimon-Einwirkung 24 h)

Tren.-Konz. (Mol/l)	$5 \cdot 10^{-7}$	$3,75 \cdot 10^{-7}$	$2,5 \cdot 10^{-7x}$	$1,25 \cdot 10^{-7}$	Kontr.
Aberr. Metaph. (%)	85	85	87	67	10
Metaph. m. mehr. Def. versch. Typs (%)	64	52	52	28	0
Chromatid-Gaps	89	61	57	16	6
Isochromatid-Gaps	69	64	39	38	0
Chromatid-Brüche	110	83	68	36	2
Isochromatid-Brüche	94	77	94	44	2
Austauschfolgen	17	13	12	8	0
Gaps pro Metaphase	1,58	1,23	0,96	0,54	0,06
Bruchereign. pro Metaph.	2,38	1,86	1,88	0,96	0,04

x = Aus 600 Metaphasen (auf 100bezogen)

b) Zeit-Effekt-Beziehung (Trenimon $6 \cdot 10^{-7}$ Mol/l; 1 h)

Erholung (h)	6	12 ^{xx}	18 ^{xx}	24 ^{xx}	Kontr. ^{xxx}
Aberr. Metaph.	68	85	86	80	10
Metaph. m. mehr. Def. versch. Typs (%)	20	45	50	43	0
Chromatid-Gaps	56	89	55	49	6
Isochromatid-Gaps	5	27	36	36	2
Chromatid-Brüche	69	103	56	55	1
Isochromatid-Brüche	7	60	130	114	1
Austauschfolgen	0	4	9	19	0
Gaps pro Metaphase	0,61	1,16	0,97	0,85	0,06
Bruchereign. pro Metaph.	0,76	1,71	2,05	2,09	0,03

xx = aus 200 Metaphasen (auf 100 bezogen)

xxx = aus 250 Metaphasen (auf 100 bezogen)

3.1.1.3) 8-Hydroxychinolinsulfat (8-HCHS)

In einer früheren Untersuchung (GEBHART 1968) wurde die zytogenetische Aktivität des Chelatbildners 8-Hydroxychinolinsulfat bereits eingehend analysiert. Das Agens induziert fast ausschließlich Gaps und Brüche, selten Chromatidaustausch. Die stärkste zytogenetische Aktivität wird in der späten Replikationsphase und der G2-Phase entfaltet, in geringerem Ausmaß werden auch Zellen in der präreplikativen G1-Phase des Zellzyklus betroffen. Die für die vorliegenden Protektoruntersuchungen wesentlichsten Ergebnisse mit 8-HCHS sind in der folgenden Tab. 4 zusammengestellt.

Tabelle 4: Zytogenetische Befunde nach Einwirkung von 8-Hydroxy-
chinolinsulfat auf menschliche Lymphocytenchromosomen.

HCHS-KONZ. (Mol/l)	$7,5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	Kontr.	
Behandlg. (h)	24	1	1	
Erholg. (h)	0 ^x	6	24	
Aberr. Metaph. (%)	40	52	37	6
Chromatid-Gaps	23	44	17	1
Isochromatid-Gaps	10	26	19	3
Chromatid-Brüche	10	18	12	1
Isochromatid-Brüche	10	5	16	1
Austauschfolgen	0,3	1	0	0
Gaps pro Metaphase	0,34	0,7	0,36	0,04
Brüche pro Metaphase	0,2	0,25	0,36	0,02

x = aus 300 Metaphasen (auf 100 Metaph. bezogen)

3.1.2) Test-Protektoren

Geeignete Protektoren gegen die clastogene Aktivität chemischer Mutagene sollten ihrerseits keine oder zumindest eine möglichst geringe chromosomenschädigende Wirkung entfalten. Aus diesem Grund wurden die als Test-Protektoren vorgesehenen Agentien vor der Überprüfung ihres anti-clastogenen Effektes einer zytogenetischen Voruntersuchung unterzogen.

3.1.2.1) Radioprotektoren

Zunächst wurden die als Radioprotektoren bereits bekannten und praktisch angewandten Agentien L-Cystein, Cysteamin und Aminoäthylisothiuronium auf potentielle chromosomenschädigende Aktivität untersucht.

Wie Tabelle 5 zusammenfassend zeigt, stieg die Aberrationsrate unter dem Einfluß der genannten Radioprotektoren ganz allgemein allenfalls schwach an, blieb aber zumeist im oberen Kontrollbereich, der aus zahlreichen Untersuchungen an unbehandelten Zellen abgeleitet werden kann. Lediglich L-Cystein induzierte in der höchsten Konzentration ($4 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) eine die Kontrollwerte übersteigende Zahl lokaler Achromasien (Gaps). Austauschfolgen fehlen - wie in allen Kontrollen - völlig.

3.1.2.2) Aminosäuren

Tabelle 6 gibt die unter der Einwirkung der Test-Aminosäuren erhobenen Befunde wieder. Die Ergebnisse mit L-Arginin, L-Glutaminsäure, L-Histidin und L-Methionin ergeben keinen Hinweis auf eine chromosomenschädigende Wirksamkeit dieser Aminosäuren im untersuchten Konzentrationsbereich. Bei L-Histidin und L-Methionin (Höchstkonzentration!) ist allenfalls die Gap-Rate leicht erhöht, übersteigt aber kaum die aus zahlreichen Untersuchungen bekannten Grenzwerte des Kontrollbereiches. Demgegenüber scheinen L-Alanin und L-Asparagin die spontane Aberrationsrate merklich zu erhöhen. Allerdings ist auch diese Erhöhung in erster Linie einer deutlichen Zunahme der Gap-Zahlen zuzuschreiben, wenngleich bei L-Asparagin auch etwas mehr Brüche zu beobachten waren, als dies üblicherweise in unbehandelten Kontrollkulturen der Fall ist. Aber auch hier fehlen Austauschfolgen (Chromatid- und Chromosomentranslokationen) völlig.

Tabelle 5: Zytogenetische Befunde nach Einwirkung von Radioprotektoren auf menschliche Lymphozytenchromosomen.

Einwirkungsdauer: 24 Std.

Protektor	L-Cystein				Cysteamin		AET	Kontr. ^x
Konz. ($\cdot 10^{-4}$ Mol/l)	4	2	1	0,5	4	0,5	1	0
Aberr. Metaph. (%)	19	10	12	9	12	8	14	8,5
Chromatid-Gaps	10	4	5	3	8	6	10	5
Isochromatid-Gaps	5	5	1	4	0	0	0	0
Chromatid-Brüche	4	3	3	2	4	2	4	2
Isochromatid-Brüche	2	0	4	0	0	0	2	1,5
Exchanges	0	0	0	0	0	0	0	0
Gaps pro Metaphase	0,15	0,09	0,06	0,07	0,08	0,06	0,1	0,05
Bruchereig. pro Metaphase	0,06	0,03	0,07	0,02	0,04	0,02	0,06	0,03

x = aus 200 Metaphasen (auf 100 bezogen)

Tabelle 6: Zytogenetische Befunde nach Einwirkung ausgewählter Aminosäuren auf menschliche Lymphozytenchromosomen.

Einwirkungsdauer: 24 Std.

Aminos.	Ala	Arg	Asp	Glus	His	Met	Kontr.
Konz. (mol/l)	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	$4 \cdot 10^{-4}$	0
Aberr. Metaph. (%)	24	8	27	8	10	13	6
Chrtid.-Gaps	18	2	16	4	8	10	1
Isochr.-Gaps	6	2	10	0	4	0	3
Chrtid.-Brüche	4	2	4	4	2	3	1
Isochr.-Brüche	0	2	6	0	0	1	1
Exchanges	0	0	0	0	0	0	0
Gaps pro Metaph.	0,24	0,04	0,26	0,04	0,12	0,10	0,04
Bruchereign. pro Metaphase	0,04	0,04	0,1	0,04	0,02	0,04	0,02

3.2) Vorversuch: Die Protektorwirkung von L-Cystein gegen die clastogene Aktivität von Myleran^R

Im Anschluß an Untersuchungen über die Wirkung von Myleran^R auf menschliche Chromosomen in vitro (GEBHART 1969) wurde geprüft, in welchem Ausmaß der gefundene Effekt durch die SH-tragende Aminosäure L-Cystein beeinflusst werden kann. Die Tests wurden in folgenden Serien durchgeführt:

- Serie I: Gleichzeitige Einwirkung von Myleran ($2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) und L-Cystein in verschiedenen Konzentrationsstufen ($4 \cdot 10^{-4}$; $2 \cdot 10^{-4}$ und 10^{-4} Mol/l) für 48 Std.
- Serie II: Gleichzeitige Einwirkung von Myleran ($2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) und L-Cystein (10^{-4} Mol/l); Fixierung nach 12, 18, 24, 36 und 48 Std. Einwirkung beider Agentien.
- Serie III: Bis zur Fixierung 48stündige Myleran-Einwirkung ($2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l); Cysteinzugabe (10^{-4} Mol/l) 48, 24, 18 und 6 Std. vor Fixierung.

Die Ergebnisse der ersten Versuchsserie sind in Abb. 2 a - c dargestellt. Unter der gleichzeitigen Einwirkung von L-Cystein wird die Zahl der durch Myleran induzierten strukturellen Chromosomenveränderungen z. T. sehr deutlich reduziert. Dieser Protektoreffekt des L-Cystein ist konzentrationsabhängig. Besonders deutlich wird dies, wenn man die Zahl der Zellen mit Aberrationen sowie die Zahl der Isochromatid-Brüche als Maß heranzieht. Auch die Achromasie- und die Bruchfrequenz nimmt mit steigender Cystein-dosis ab.

Der Einfluß der Aminosäure L-Cystein auf die zytogenetische Effektivität des Myleran war auch von der Einwirkungsdauer abhängig (Abb. 3 a-e). Auffallenderweise ist in den Kulturen, die 24 bzw. 36 Stunden mit Myleran und dem Radioprotektor gleichzeitig behandelt worden waren, kein Protektoreffekt des L-Cystein nachzuweisen. Sehr deutlich ist er dagegen nach 48stündiger Einwirkung; aber auch nach 12-bzw. 18-stündiger Behandlung läßt sich der reduzierende Effekt noch gut nachweisen. Sämtliche untersuchten Aberrationstypen (die in diesem Fall sehr seltenen Chromatid- und Chromosomen-Exchanges wurden nicht berücksichtigt) werden in etwa der gleichen Weise beeinflusst.

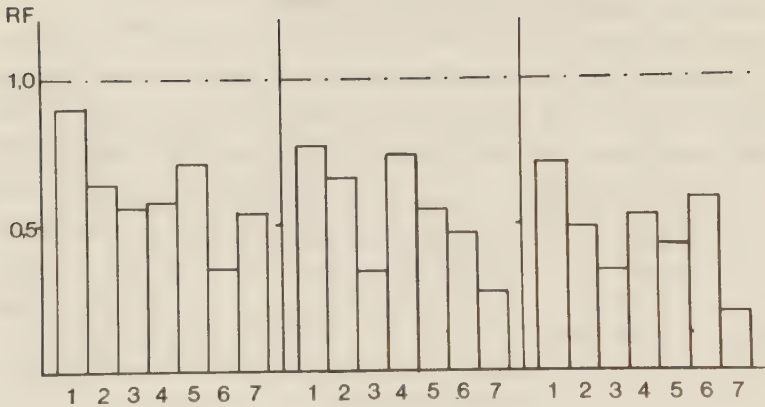


Abb. 2: Dosis-Abhängigkeit des Protektoreffektes von L-Cystein gegen die aberrationsauslösende Wirkung von Myleran ($2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) bei gleichzeitiger Einwirkung (48 h). Cystein-Konzentration: a) 10^{-4} Mol/l; b) $2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l; c) $4 \cdot 10^{-4}$ Mol/l.

Erläuterungen zu den graphischen Darstellungen

In allen Abb. wird die Zahl der durch das jeweilige Test-Mutagen induzierten Defekte durch die 1,0-Linie repräsentiert. Der Anteil der unter gleichzeitiger Einwirkung von Mutagen und Test-Protector auftretenden Aberrationen wird als Bruchteil (Reduktionsfaktor RF) davon dargestellt.

In den Säulendiagrammen (Abb. 2 bis Abb. 7) werden folgende Werte wiedergegeben:

- Säule 1 Anteil aberranter Metaphasen
- 2 Zahl der Achromasien (Gaps) pro Metaphase
- 3 Zahl der Bruchereignisse pro Metaphase
- 4 Zahl der Chromatid-Gaps
- 5 Zahl der Isochromatid-Gaps
- 6 Zahl der Chromatid-Brüche
- 7 Zahl der Isochromatid-Brüche
- 8 Zahl der Austauschfiguren (Exchanges);
(- nur bei Verwendung von Trenimon angegeben)

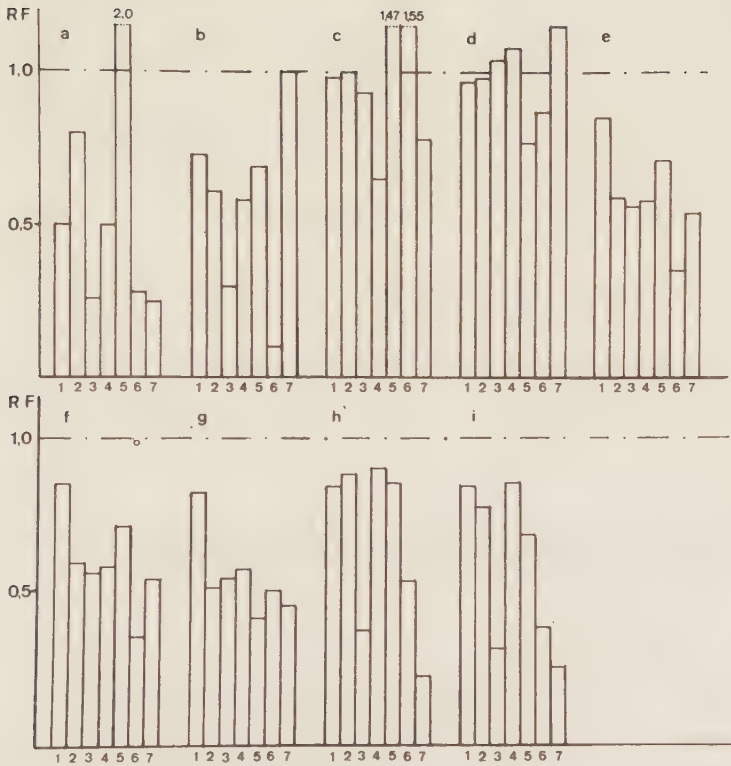


Abb. 3: Zeit-Abhängigkeit des Protektor-Effektes von L-Cystein (10^{-4} Mol/l) gegen die aberrations-auslösende Wirkung von Myleran ($2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l). Serie 1: Gleichzeitige Einwirkung von Myleran und L-Cystein für 12 h (a); 18 h (b); 24 h (c); 36 h (d); und 48 h (e). Serie 2: Myleran-Einwirkung 48 h; Cystein-Zugabe 48 h (f); 24 h(g); 18 h (h); und 6 h(i) vor Fixierung.

Die Resultate der dritten Testserie (Abb. 3 f - i) lassen im wesentlichen erkennen, daß die aberrationshemmende Wirkung des L-Cystein der Einwirkungsdauer nicht direkt proportional ist. Die Zahl der Zellen, die nach 48-stündiger Myleran-Behandlung Aberrationen aufweisen, nimmt ohne Beziehung zum Zeitpunkt der Protektor-Zugabe immer in etwa gleichem Ausmaß ab. Die Zahl der Isochromatid-Brüche wird sogar erheblich deutlicher reduziert, wenn das L-Cystein erst 18 bzw. 6 Stunden vor Fixierung der Kulturen zugegeben wird.

Mit diesen Untersuchungen war erstmals gezeigt worden, daß der Radioprotektor L-Cystein in menschlichen Lymphozyten in vitro auch die zytogenetische Wirksamkeit chemischer Mutagene (in diesem Falle die eines bifunktionellen alkylierenden Agens) zu reduzieren vermag.

3.3) Screening-Untersuchungen mit verschiedenen potentiellen Protektoren.

3.3.1) Radioprotektoren

Auf Grund der positiven Resultate mit L-Cystein und Myleran lag die Vermutung nahe, daß die bekannten Radioprotektoren auch gegenüber anderen chemischen Mutagenen eine gewisse Schutzwirkung entfalten könnten. Deshalb wurde in übersichtsmäßigen Reihenversuchen die Wirkung der Radioprotektoren L-Cystein, Cysteamin und Aminoäthylisothiouronium (AET) auf die clastogene Aktivität des trifunktionellen Äthyleniminderivates Trenimon^R und des Chelatbildners 8-Hydroxychinolinsulfat (8HCHS) überprüft.

Mutagen- und Test-Protektor (10^{-4} Mol/l) wirkten bei diesen Versuchen gleichzeitig für 24 Stunden auf die Zellen ein.

Wie Abb. 4 a zeigt, wird unter dem Einfluß von L-Cystein die Trenimon-induzierte Bruchrate leicht reduziert (RF: 0,72), die Zahl der Gaps wird dagegen nur sehr geringfügig beeinflusst.

Die unter Trenimon-Einwirkung relativ häufigen Chromatid-Exchanges nehmen unter dem Einfluß der SH-Verbindung ebenfalls leicht ab. Der statistische Vergleich der durchschnittlichen Aberrationsraten aus Trenimon-behandelten Kulturen mit und ohne Zusatz von L-Cystein ergibt insgesamt eine schwach signifikante Abnahme ($P < 0,1$) unter der Protektoreinwirkung.

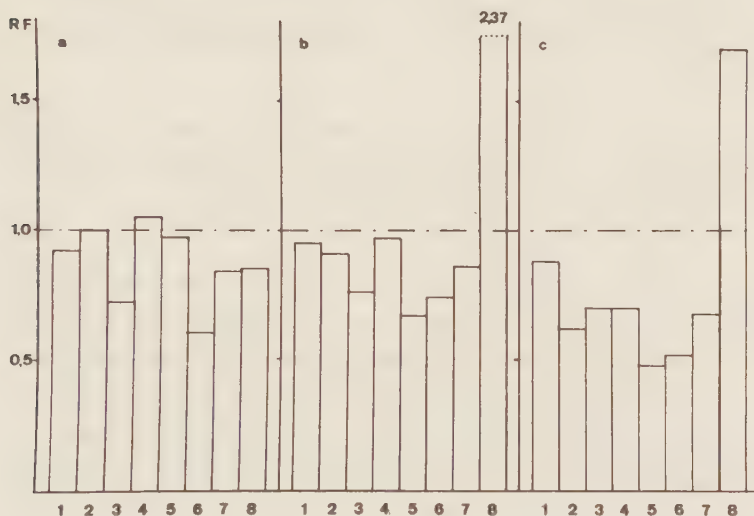


Abb. 4: Vorversuche über die Wirkung von Radioprotektoren (10^{-4} Mol/l) auf die Aberrationsinduktion durch Trenimon^R ($2,5 \cdot 10^{-7}$ Mol/l) bei gleichzeitiger 24-stündiger Einwirkung. a) L-Cystein; b) Cysteamin; c) AET

Bei Verwendung von Cysteamin als Protektor (Abb. 4 b) ist der Reduktionseffekt bei den Gaps etwas klarer nachzuweisen (RF: 0,8) als nach cystein-Einwirkung, bei den Brüchen ergibt sich etwa der gleiche Reduktionsfaktor (0,7) wie nach L-Cystein. Die Zahl der Austauschfolgen ist gegenüber den nur mit Trenimon behandelten Zellen auffallend erhöht.

Den eindeutigsten Protektoreffekt gegen die zytogenetische Aktivität des Trenimon zeigte in diesen Vorversuchen das AET (Abb. 4 c). Der Reduktionsfaktor liegt hier bei einigen Defekttypen (z. B. bei den Brüchen) im Bereich von 0,5, im Durchschnitt beträgt er 0,78 ($P < 0,05$). Allerdings ist auch hier - wie schon nach Einwirkung von Cysteamin - die Zahl der Translokationen deutlich gegenüber den nur mit Trenimon behandelten Zellen erhöht.

Bemerkenswert erscheint die sehr deutliche Abnahme des Anteils jener Zellen, die mehrere Aberrationen verschiedenen Typs aufweisen, unter dem Einfluß aller drei Radioprotektoren.

Verwendet man für die Screening-Tests mit den Radioprotektoren anstelle des Trenimon 8-HCHS als Modell-Clastogen so ergibt sich ein völlig anderes Bild der Protektoraktivität (Abb. 5 a - c). Hier scheint L-Cystein die intensivste Schutzwirkung auszuüben (RF: 0,45; $P < 0,01$). Der Protektoreffekt des Cysteamin hat ein ganz ähnliches Ausmaß (RF: 0,5; $P < 0,01$), während AET nur eine relativ geringe reduzierende Wirkung gegen die clastogene Aktivität des 8-HCHS entfaltet (RF: 0,8; $P < 0,1$). Vor allem die Chromatiddefekte bleiben unter der Einwirkung des AET weitgehend unbeeinflusst, die Zahl der Chromatid-Brüche steigt sogar gegenüber den nur mit 8-HCHS behandelten Vergleichskontrollen leicht an.

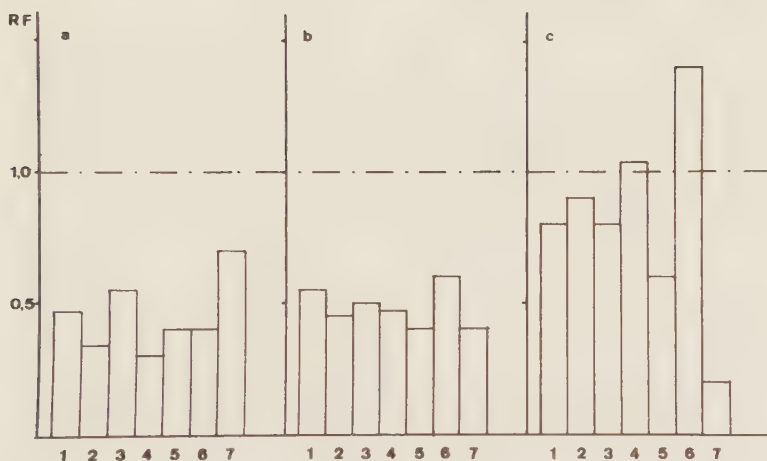


Abb. 5: Vorversuche über die Wirkung von Radioprotektoren (10^{-4} Mol/l) auf die Aberrationsinduktion durch 8-Hydroxychinolinsulfat ($7,5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l) bei gleichzeitiger 24-stündiger Einwirkung. a) L-Cystein; b) Cysteamin; c) AET

3.3.2) Aminosäuren

Natürlich vorkommende und im Körper permanent vorhandene oder metabolisierte Substanzen mit Protektorwirkung dürften für eine praktische Anwendung die geringsten Gefahren unerwünschter Nebenwirkungen in sich bergen. Deshalb wurde auch eine Reihe von Aminosäuren in die Vorprüfung auf anticlastogene Wirkung mit einbezogen. Wie schon bei den vorher geschilderten Versuchen mit Radioprotektoren dienten auch hier wieder Trenimon^R und 8-HCHS als Modell-Clastogene.

Die vergleichende Betrachtung der mit Trenimon erhobenen Befunde (Abb. 6) läßt erkennen, daß lediglich die Aminosäuren L-Asparagin (Abb. 6 c) und L-Methionin (Abb. 6 f) unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine eindeutige Schutzwirkung gegen die clastogene Aktivität von Trenimon entfalten ($RF_{Asp} = 0,8$; $P < 0,05$; $RF_{Met} = 0,75$; $P < 0,05$). Wie die quantitative Analyse der einzelnen Defekttypen ergibt, werden unter dem Einfluß von L-Asparagin Isochromatid-Gaps ($RF = 0,59$), sowie Chromatid- ($RF = 0,57$) und Isochromatid-Brüche ($RF = 0,67$) besonders deutlich beeinflußt. Durch Methionin wird die Zahl Trenimon-induzierter Gaps und Brüche in etwa dem gleichen Ausmaß verringert. Die vergleichende Betrachtung der mit den verschiedenen Aminosäuren gewonnenen Ergebnisse zeigt, daß nicht nur unter der Einwirkung der Aminosäuren ohne erkennbaren Schutzeffekt, sondern auffallenderweise auch unter der Einwirkung von L-Asparagin und L-Methionin die Zahl der Translokationsfolgen gegenüber den nur mit Trenimon behandelten Kulturen mehr oder weniger deutlich erhöht ist.

Die Zahl der Zellen mit mehreren chromosomalen Strukturveränderungen verschiedenen Typs wird unter dem Einfluß der Aminosäuren L-Asparagin und L-Methionin - wie auch schon durch die Radioprotektoren - deutlich verringert.

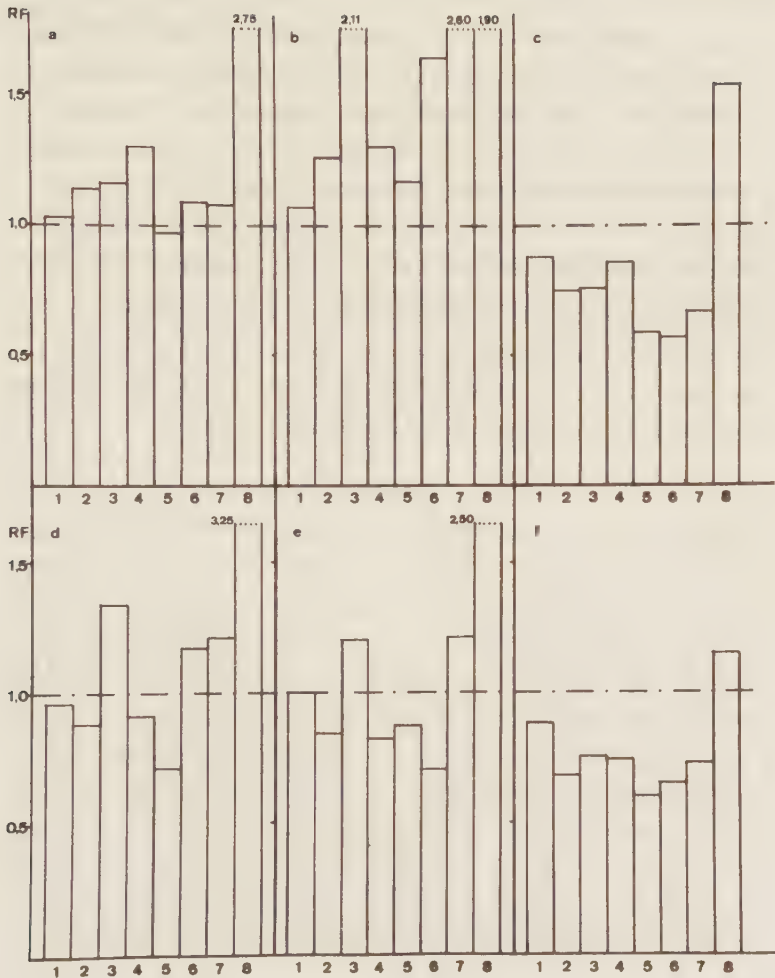


Abb. 6: Vorversuche über die Wirkung einiger Aminosäuren (10^{-4} Mol/l) auf die Aberrationsinduktion durch Trenimon ($2,5 \cdot 10^{-7}$ Mol/l) bei gleichzeitiger 24-stündiger Einwirkung. a) L-Alanin; b) L-Arginin; c) L-Asparagin; d) L-Glutaminsäure; e) L-Histidin; f) L-Methionin

Die Ergebnisse der Aminosäuren-Screening-Tests mit dem Modell-Clastogen 8-HCHS sind in Abb. 7 zusammengestellt. Auch in dieser Testserie erwies sich L-Asparagin (Abb. 7 c) als effektivster Protektor (RF = 0,54; $P < 0,025$). Brüche wurden stärker beeinflusst als Gaps. Auch für L-Glutaminsäure (Abb. 7 d) konnte eine signifikante Protektortendenz nachgewiesen werden (RF = 0,77; $P < 0,05$). Besonders niedrig war die Zahl der 8-HCHS-induzierten Isochromatid-Brüche unter dem Einfluß dieser Aminosäure (RF = 0,4).

Im Gegensatz zu den mit Trenimon erhobenen Befunden konnte L-Methionin die HCHS-induzierte Aberrationsrate nicht signifikant verringern ($P > 0,1$), wenngleich die Zahl der Isochromatid-Defekte unter dem Einfluß dieser Aminosäure deutlich abnimmt.

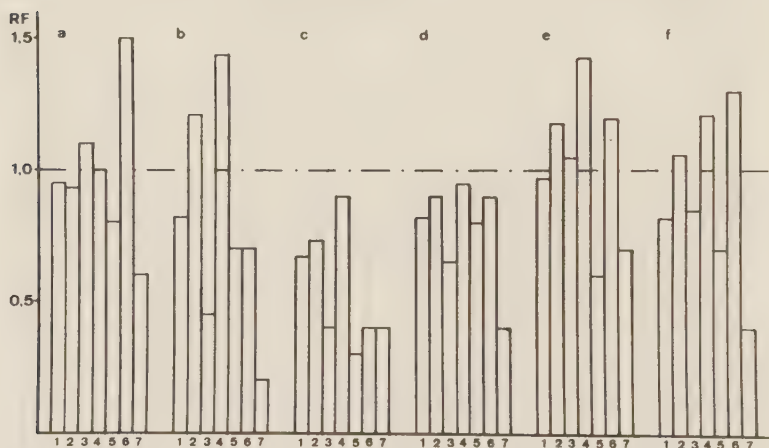


Abb. 7: Vorversuche über die Wirkung einiger Aminosäuren (10^{-4} Mol/l) auf die Aberrationsinduktion durch 8-Hydroxyquinolinsulfat ($7,5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l) bei gleichzeitiger 24-stündiger Einwirkung. a) L-Alanin; b) L-Arginin; c) L-Asparagin; d) L-Glutamin-Säure; e) L-Histidin; f) L-Methionin.

3.4) Dosis-Effekt-Beziehungen

Auf der Basis der Ergebnisse der vorher geschilderten Screening-Tests sollte mit Hilfe von Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit des Protektoreffektes die Wirksamkeit der einzelnen Schutzstoffe genauer analysiert werden. In diese vergleichenden Dosis-Effekt-Versuche wurden alle Substanzen einbezogen, die bei den vorangegangenen Screening-Tests eine "deutliche" Schutzwirkung ($RF \leq 0,75$) erkennen ließen. Als Modell-Clastogene dienten wiederum Trenimon^R und 8-HCHS.

3.4.1) Trenimon^R als Modell-Clastogen

3.4.1.1) L-Cystein als Test-Protector

In einer ersten Testserie sollte die Abhängigkeit des für L-Cystein ermittelten Protektoreffektes von der Konzentration des Schutzstoffes in den Kulturen geprüft werden. Die Trenimonkonzentration wurde bei diesen Versuchen konstant bei $2,5 \cdot 10^{-7}$ Mol/l gehalten.

Wie Abb. 8 A zeigt, war eine Dosisabhängigkeit des Protektoreffektes bei den einzelnen Defekttypen in verschieden starkem Ausmaß zu beobachten. Während der Anteil aberranter Metaphasen sowie der Gaps pro Metaphase mit zunehmender Cystein-Konzentration nur geringfügig abnimmt, ist der Effekt bei den Zellen mit mehreren Aberrationen verschiedenen Typs (vAT) sowie bei den Brüchen pro Metaphase sehr deutlich konzentrationsabhängig. Die Detail-Analyse der einzelnen Aberrationstypen läßt drei Effekte der Cystein-Behandlung deutlich werden:

- 1) Die Zahl der Trenimon-induzierten Gaps wird überhaupt erst bei höheren Cystein-Konzentrationen und auch da in erheblich geringfügigerem Ausmaß reduziert als die der Brüche.
- 2) Chromatid-Aberrationen werden generell stärker beeinflusst als Isochromatid-Aberrationen.

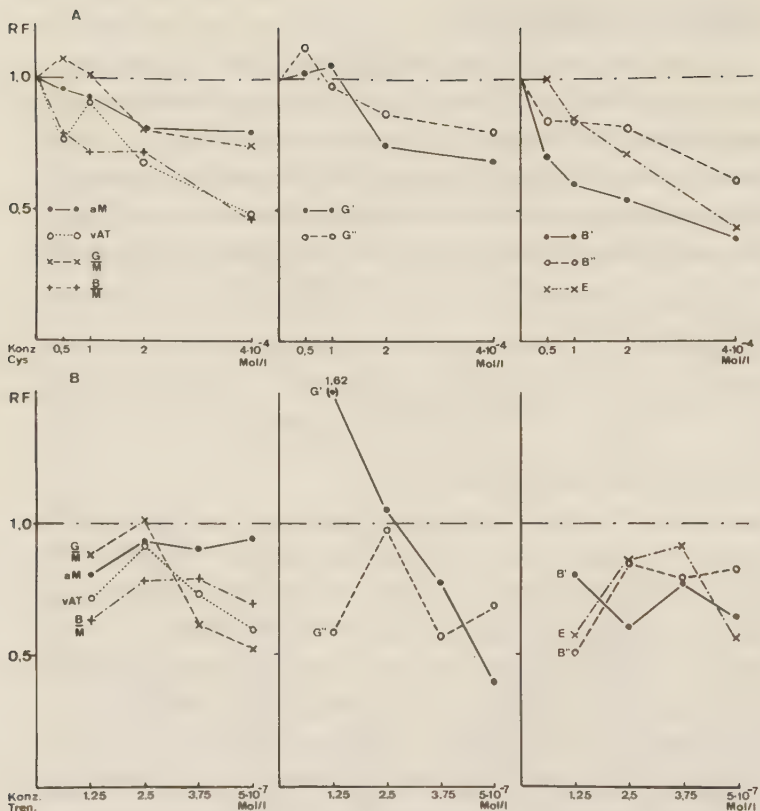


Abb. 8: Dosis-Abhängigkeit des Protektoreffektes von L-Cystein gegen die aberrationsauslösende Wirkung von Trenimon bei gleichzeitiger Einwirkung (24 h).

A) Abhängigkeit von der Cysteindosis (Trenimon $2,5 \cdot 10^{-7}$ Mol/l)

B) Abhängigkeit von der Trenimondosis (L-Cystein 10^{-4} Mol/l)

aM = Anteil aberranter Metaphasen; vAT = Metaphasen mit Aberrationen verschiedenen Typs; $\frac{G}{M}$ = Gaps pro Metaphase; $\frac{B}{M}$ = Bruchereignisse pro Metaphase; G' = Chromatid-Gaps; G'' = Isochromatid-Gaps; B' = Chromatid-Brüche; B'' = Isochromatid-Brüche; E = Austauschfolgen (Translokationen).

3) Auch Chromatid-Austausch (Translokationskreuze und -triradiale) war mit steigender Cysteindosis seltener zu beobachten als unter der Einwirkung von Trenimon allein.

In einer zweiten Testserie sollte geklärt werden, ob, und in welchem Ausmaß die Effektivität des L-Cystein (konstant 10^{-4} Mol/l) auch von der Konzentration des Clastogens abhängig ist. Dabei konnte, wie aus Abb. 8B hervorgeht, keine klare Beziehung zwischen Clastogen- Konzentration und Protektoreffekt ermittelt werden. Bei der höchsten Trenimon-Konzentration ist der Unterschied der Aberrationsraten mit und ohne Protektor allerdings deutlich signifikant ($P < 0,05$). In den übrigen Konzentrationsstufen war dieser Unterschied auf dem 5 %-Niveau statistisch nicht zu sichern.

3.4.1.2) Cysteamin als Test-Protektor

Die Dosis-Abhängigkeit des Protektoreffektes von Cysteamin wurde bei einer konstanten Trenimon-Konzentration von 10^{-7} Mol/l geprüft. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 dargestellt.

Im Gegensatz zu den mit L-Cystein erhobenen Befunden nimmt unter dem Einfluß des Cysteamin die Zahl der Gaps pro Metaphase deutlicher ab als die der Brüche pro Metaphase (RF_{Gaps} : 0,84 bis 0,5; $RF_{\text{Brüche}}$: 0,82 bis 0,64). Während der Gap-Index abgesehen von einem gewissen Sättigungsbe-
reich ($2 \cdot 10^{-4}$ bis $4 \cdot 10^{-4}$ Mol/l Cysteamin) eine deutliche Dosis-Abhängig-
keit erkennen läßt, bleibt der Bruch-Index ohne klare Dosis-Beziehung im
Durchschnitt immer etwa auf dem gleichen Niveau (RF : 0,8). Die Zahl der
Zellen mit mehreren Aberrationen verschiedenen Typs wird ohne erkennbare
Dosis-Abhängigkeit durch alle Cysteamin-Konzentrationen deutlich redu-
ziert ($RF = 0,6$). Der Gesamtanteil aberranter Metaphasen nimmt dagegen
nur relativ geringfügig ab ($RF_{\text{max.}} = 0,8$).

Die Analyse der einzelnen Defekttypen läßt erkennen, daß unter dem Ein-
fluß des Cysteamin die Zahl der Gaps in stärkerem Ausmaß und deutlicher
dosis-abhängig abnimmt als die der Brüche. Die Anzahl der Chromatid-
aberrationen wird im Gegensatz zu den mit L-Cystein erhobenen Befunden
weniger reduziert als die der Isochromatid-Aberrationen. Auffallend er-
scheint hier, - wie auch schon bei den Screening-Tests-, die deutliche
Zunahme der Austauschereignisse in den beiden höchsten Cysteamin-Konzen-

trationen ($2 \text{ bzw. } 4 \cdot 10^{-4} \text{ Mol/l}$), nachdem ihre Zahl in den niedrigeren Konzentrationsbereichen deutlich reduziert erscheint.

3.4.1.3) AET als Test-Protector

Ein von den bisher dargestellten Dosis-Effekt-Beziehungen wiederum etwas abweichendes Bild ergibt sich bei der Betrachtung der Dosis-Abhängigkeit des Protektoreffektes von AET (Abb. 10). Auch hier wurde, - wie bei den Tests mit Cysteamin-, die Endkonzentration des Trenimon in den Kulturen konstant bei 10^{-7} Mol/l gehalten.

Zunächst fällt der starke Rückgang der Brüche pro Metaphase unter dem Einfluß des AET auf (RF bis 0,38), wobei dieser Effekt nur bis 10^{-4} Mol/l deutlich von der applizierten AET-Dosis abhängig erscheint, während in den höheren Konzentrationsbereichen keine weiteren Steigerung dieses Reduktionseffektes mehr festgestellt werden konnte (Sättigungs-Effekt?).

Die Zahl der Gaps pro Metaphase nahm gegenüber der Bruchrate zwar in schwächerem Ausmaß, aber doch deutlich konzentrationsabhängig ab. Beachtlich war auch der Rückgang des Anteils der Metaphasen mit mehreren Defekten verschiedenen Typs unter der AET-Einwirkung, der auch eine klare Dosis-Abhängigkeit zeigte (RF: 0,57 - 0,41 - 0,36 - 0,36 - und 0,24). Eine deutliche Auswirkung des AET-Einflusses konnte auch auf die Zahl der aberranten Metaphasen beobachtet werden.

Die Analyse der einzelnen Defekttypen ergab eine drastische konzentrationsabhängige Reduktion der Isochromatid-Defekte sowohl bei den Gaps als auch bei den Brüchen (bei der höchsten AET-Konzentration RF: 0,23 bzw. 0,21). Die Chromatid-Aberrationen scheinen demgegenüber nur in geringerem Ausmaß beeinflußt zu werden. Wie bereits bei den vorher geschilderten Versuchen das L-Cystein, so zeigte auch das AET ein eindeutlicheren Schutzeffekt gegenüber Bruch-Aberrationen als gegenüber Achromasien (Gaps).

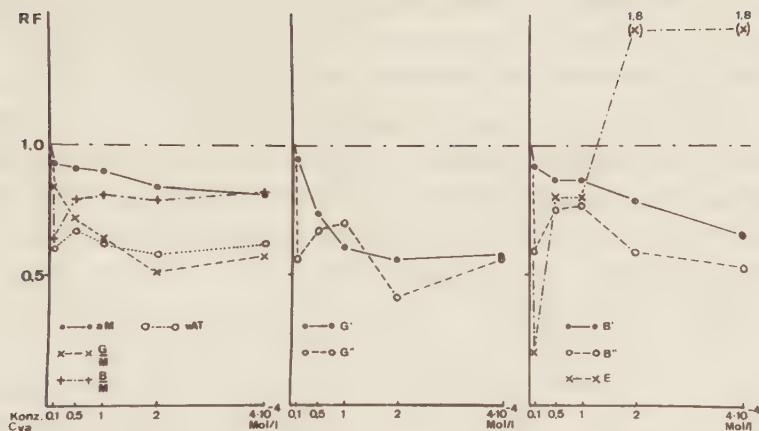


Abb. 9: Dosis-Abhängigkeit des Protektoreffektes von Cysteamin gegen die aberrationsauslösende Wirkung von Trenimon (10^{-7} Mol/l) bei gleichzeitiger Einwirkung (24 h).

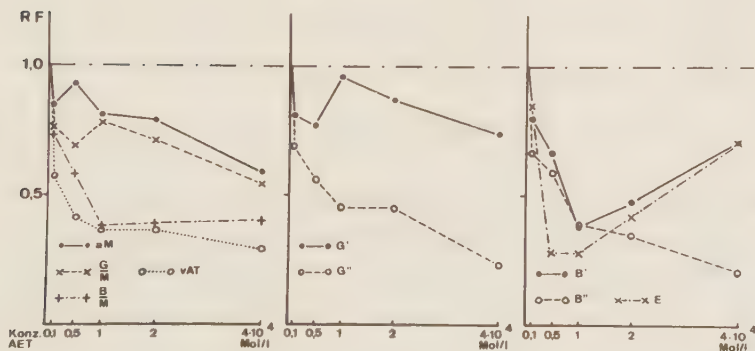


Abb. 10: Dosis-Abhängigkeit des Protektoreffektes von AET gegen die aberrationsauslösende Wirkung von Trenimon (10^{-7} Mol/l) bei gleichzeitiger Einwirkung (24 h).
Symbole in Abb. 9 und 10 wie in Abb. 8.

3.4.1.4) L-Methionin und L-Asparagin

Die vorausgegangenen Screening-Tests über eine mögliche Protektorwirkung von Aminosäuren gegen die chromosomenschädigende Wirksamkeit von Trenimon hatten für L-Methionin und L-Asparagin positive Ergebnisse erbracht.

Die vergleichende Betrachtung der Ergebnisse aus Dosis-Effekt-Tests mit diesen beiden Aminosäuren (Abb. 11) läßt für beide Substanzen eine erheblich schwächere Protektorwirkung und eine deutlich geringere Dosisabhängigkeit erkennen als dies bei den vorher geschilderten Untersuchungen mit den Radioprotektoren der Fall war.

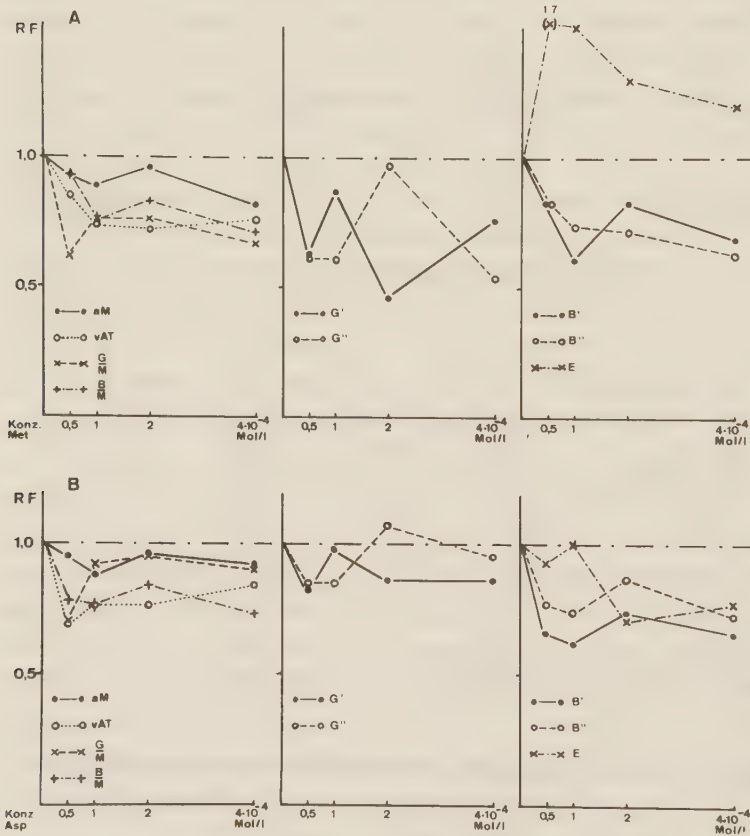


Abb. 11: Dosis-Abhängigkeit des Protektoreffektes von L-Methionin und L-Asparagin gegen die aberrationsauslösende Wirkung von Trenimon ($2,5 \cdot 10^{-7}$ Mol/l) bei gleichzeitiger Einwirkung (24 h).

A) L-Methionin; B) L-Asparagin

Zur Erläuterung der verwendeten Symbole siehe Abb. 8

Sowohl unter der Einwirkung von Methionin (Abb. 11 A) wie von Asparagin (Abb. 11 B) wird die Trenimon-induzierte Bruchrate ohne klare Dosis-Beziehung relativ deutlich gesenkt ($RF: 0,7$). Die Rate der Gaps pro Metaphase nimmt nur unter Methionin-Einwirkung merklich ab ($RF_{max}: 0,67$), während ein vergleichbarer Effekt des L-Asparagin auf die Achromasie-rate nur in der niedrigsten Konzentrationsstufe beobachtet werden konnte. Die Analyse der einzelnen Defekttypen läßt infolge der relativ großen Schwankungsbreiten der Ergebnisse (vor allem bei den Gaps) nur bei den Brüchen eine gewisse Konzentrationsabhängigkeit des Protektoreffektes beider Aminosäuren erkennen. Bemerkenswert erscheint hier wieder der deutliche Anstieg der Zahl Trenimon-induzierter Translokationen (E) unter dem Einfluß von L-Methionin. L-Asparagin in höherer Konzentration vermindert dagegen die Translokationszahlen.

3.4.2) 8-HCHS als Modell-Clastogen

Um die Beurteilung der Effektivität der potentiellen Protektoren nicht allein auf die mit den alkylierenden Agens Trenimon erhobenen Befunde zu stützen, erschien es notwendig, die Dosis-Effekt-Beziehungen auch an einem Clastogen mit anderem zytogenetischem Wirkungsmechanismus zu untersuchen. Dazu erschien, - wie schon bei den Screening-Tests -, der Chelatbildner 8-HCHS besonders geeignet.

3.4.2.1) Vergleichende Dosis-Effekt-Untersuchungen mit den drei Radioprotektoren

Im Gegensatz zu den gleichen Untersuchungen mit Trenimon als aberrations-auslösendem Agens war die Abnahme des Anteils aberranter Zellen in Abhängigkeit von der L-Cystein - bzw. der Cysteamin-Konzentration in den Versuchen mit 8-HCHS sehr deutlich (Vgl. Abb. 12 A und 12 B). Der durchschnittliche Unterschied der Aberrationsraten mit und ohne Protektoreinfluß ist deutlich signifikant ($P < 0,05$). Das gleiche gilt auch für die Gap- und die Bruchrate, wobei die erstere durch die Protektoren stärker beeinflußt wird als letztere. Eine Untersuchung der Zahl von Zellen mit mehreren Aberrationen verschiedener Defekttypen war angesichts des Wirkungsspektrums von 8-HCHS nicht sinnvoll.

Die Analyse der einzelnen Aberrationstypen ergibt für L-Cystein und Cysteamin ebenfalls gut Übereinstimmende Resultate (Abb. 12 A, B). Durch beide Protektoren wird die Zahl 8-HCHS-induzierter Gaps noch etwas deutlicher reduziert, als die der Brüche. Der Protektoreffekt ist in beiden Fällen dosisabhängig, wobei sich allerdings in den höheren Protektorkonzentrationen ein gewisser "Sättigungseffekt" zeigt (kein weiteres Absinken der Aberrationsfrequenzen mit der Dosis). Während durch L-Cystein Chromatid-Defekte deutlicher reduziert werden als Isochromatid-Defekte, ist unter der Einwirkung von Cysteamin meist ein umgekehrtes Ergebnis zu beobachten.

Das Spektrum der Protektorwirkung von AET unterscheidet sich von dem des L-Cystein und des Cysteamin so wesentlich, daß es einer eingehenderen Betrachtung wert erscheint. Wie Abb. 12 C erkennen läßt, ergibt sich für die Abnahme der Zahl aberranter Zellen sowie der Gaps pro Metaphase unter der Einwirkung von AET keine eindeutige Dosis-Effekt-Beziehung. Gerade bei der höchsten AET-Konzentration liegen die beiden genannten Werte wieder im Bereich der nur mit 8-HCHS behandelten Zellen. Die Bruchrate wird dagegen mit zunehmender AET-Konzentration in der Kultur deutlich gesenkt. Auch die Analyse der einzelnen 8-HCHS-induzierten Chromosomendefekttypen erbringt z. T. Resultate, die sich von den mit den beiden SH-Verbindungen gewonnenen wesentlich unterscheiden. So wird die Zahl der Isochromatid-Defekte durch AET in erheblich stärkerem Ausmaß beeinflußt als die Zahl der Chromatid-Defekte. Die Zahl der Chromatid-Gaps bleibt z. B. unter der Einwirkung dieses Radioprotektors nahezu unverändert, während die Zahl der Isochromatid-Gaps in den gleichen Kulturen ganz erheblich abnimmt. In den höchsten AET-Konzentrationen fällt allerdings auch bei diesem Defekt-Typ ein merkliches Ansteigen auf. Die Zahl 8-HCHS-induzierter Chromatid-Brüche wird durch AET nur in den beiden Höchstkonzentrationen merklich reduziert (RF: 0,6 bis 0,5). Die Isochromatid-Brüche nehmen demgegenüber erheblich stärker ab (RF: bis 0,2), jedoch scheint hier eine negative Korrelation zwischen Effekt und applizierter AET-Dosis zu bestehen.

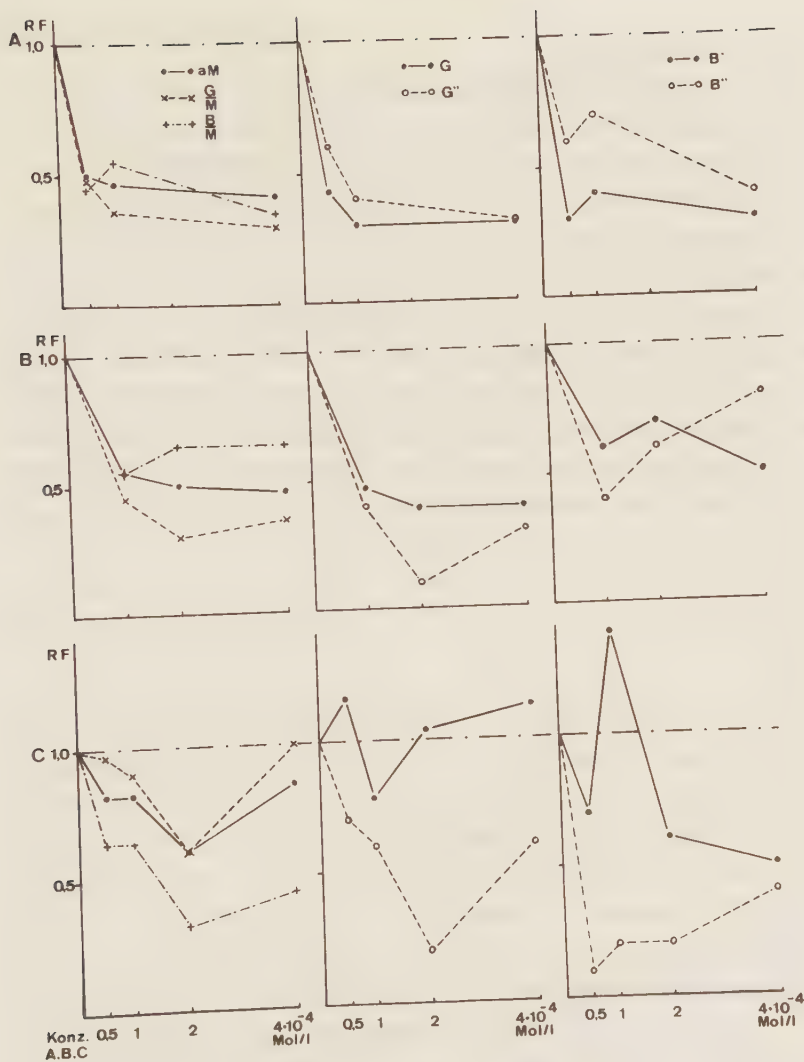


Abb. 12: Dosis-Abhängigkeit des Protektoreffektes von L-Cystein, Cysteamin und AET gegen die aberrationsauslösende Wirkung von 8-Hydroxychinolinsulfat ($7,5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l) bei gleichzeitiger Einwirkung (24 h).

A) L-Cystein; B) Cysteamin; C) AET

Weitere Erläuterungen siehe Abb. 8

3.4.2.2) L-Asparagin

Die einzige (nicht SH-tragende) Aminosäure, die in den Screening-Tests mit 8-HCHS eine signifikante Protektorwirkung hatte erkennen lassen, war L-Asparagin. Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit der Protektorwirkung dieser Aminosäure sollten zur Spezifizierung dieser Schutzwirkung beitragen.

Wie Abb. 13 zeigt, war ein einigermaßen klarer Protektoreffekt des L-Asparagin gegenüber der chromosomenschädigenden Wirkung von 8-HCHS durchaus festzustellen ($P < 0,05$), der jedoch keine eindeutige Dosis-Abhängigkeit erkennen ließ. Gaps werden in erheblich stärkerem Ausmaß ($P < 0,05$) verhindert als Brüche ($P < 0,1$). Außer bei den Chromatid-Gaps zeigt sich bei keinem Defekttyp eine klare Abhängigkeit der Schutzwirkung von der Asparaginkonzentration in der Kultur.

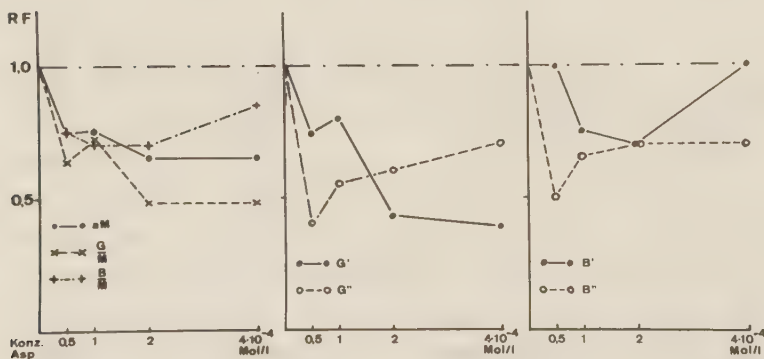


Abb. 13: Dosis-Abhängigkeit des Protektoreffektes von L-Asparagin gegen die aberrationsauslösende Wirkung von 8-Hydroxychinosulfat ($7,5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l) bei gleichzeitiger Einwirkung (24 h). Weitere Erläuterungen siehe Abb. 8

3.5) Zeit-Effekt-Beziehungen

Bei der Untersuchung der Dosisabhängigkeit des Protektoreffektes hatte sich verschiedentlich gezeigt, daß die einzelnen Aberrationstypen unter der Einwirkung des jeweiligen Schutzstoffes in durchaus unterschiedlichem Ausmaß beeinflußt werden. Unter Umständen könnte dies mit einer noch unklaren Zellzyklusspezifität der Protektorwirkung in Verbindung gebracht werden. Über die Klärung einer solchen zellzyklusspezifischen Wirksamkeit hinaus erscheint es auch von großer praktischer Bedeutung, Antworten auf die Fragen zu finden, ob durch die Protektoren die Chromosomenstruktur im allerweitesten Sinne "prophylaktisch" stabilisiert wird, ob die Protektoren direkt in den Aberrationsauslösungsprozeß eingreifen, oder ob sie bereits induzierte Aberrationen zu reparieren in der Lage sind. Alle diese Probleme lassen sich durch eine genauere Analyse der Bedeutung des Einwirkungszeitpunktes für die Protektoreffektivität einer Lösung näher bringen.

3.5.1) Vorbehandlung mit dem Protektor

Zur Klärung der Frage inwieweit die Chromosomenstruktur durch Protektoren prophylaktisch geschützt werden kann, wurde am Modell L-Cystein/Trenimon der Effekt einer 18-stündigen Vorbehandlung mit verschiedenen Dosen der SH-Verbindung überprüft. Die Aminosäure wurde dann aus den Kulturen entfernt, worauf eine 24-stündige Nachbehandlung mit Trenimon ($2,5 \cdot 10^{-7}$ Mol/l) folgte. Wie Tabelle 7 zeigt, blieb die 18-stündige Vorbehandlung mit L-Cystein ohne erkennbare Auswirkung auf den Anteil von Metaphasen mit Trenimon-induzierten chromosomalen Strukturdefekten. Der Anteil jener Metaphasen, die mehrere Aberrationen verschiedenen Typs enthielten, blieb ebenfalls weitgehend unbeeinflusst. Die zahlenmäßige Analyse der auftretenden Einzeldefekte ließ allenfalls in der höchsten Protektorkonzentration einen schwachen reduzierenden Einfluß der Cystein-Vorbehandlung erkennen. Dabei ergab sich allerdings keine Verringerung der Zahl der

Austauschfolgen und nur eine sehr geringfügige Abnahme der Isochromatid-Brüche. Dagegen war in den beiden niedrigeren Protektorkonzentrationen die Zahl der Isochromatid-Defekte gegenüber den nur mit Trenimon behandelten Zellen sogar erhöht.

Tabelle 7: Die Beeinflussung der cytogenetischen Wirkung einer 24-stündigen Trenimonbehandlung ($2,5 \cdot 10^{-7}$ Mol/l) durch eine 18-stündige Vorbehandlung mit L-Cystein in verschiedenen Konzentrationen.

Cys-Konz.(Mol/l)	0	10^{-4}	$2 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$	0-Kontr.
Aberr. Metaph.(%)	83	80	88	87	9
Metaph.m.mehr.					
Def.versch.Typs (%)	44	54	48	39	0
Chromatid-Gaps	42	35	27	32	5
Isochromatid-Gaps	51	55	69	33	1
Chromatid-Brüche	73	55	65	51	1
Isochromatid-Brüche	92	105	156	84	3
Exchanges	15	23	11	14	0
Gaps pro Metaph.	0,93	0,90	0,96	0,65	0,06
Bruchereign. pro Metaph.	1,95	2,06	2,43	1,63	0,04

3.5.2) Gleichzeitige Einwirkung von Protektor und Clastogen während verschiedener Zellzyklusphasen

Die meisten heute bekannten chemischen Mutagene zeigen eine durchaus zellzyklusspezifische Effektivität. Es lag daher nahe, auch einige ausgewählte Protektorsubstanzen auf Unterschiede ihrer Wirksamkeit in den verschiedenen Zellzyklusphasen zu testen. Zu diesem Zweck wurden Modell-Clastogen und Protektor gleichzeitig für eine Stunde den Kulturen zugegeben. Nach sorgfältiger Entfernung der Wirkstoffe wurde bis zur Fixierung verschieden lange Zeiten weiterkultiviert ("Erholungs-

zeit"). Die Dauer dieser Erholungszeit wurde jeweils an den für den Zellzyklus menschlicher Lymphozyten bekannten Phasenzeiten orientiert. Verschiedene Autoren (z. B. BIANCHI, DE BIANCHI 1965; GEY 1970) geben für die Replikationsphase (S-Phase) in menschlichen Lymphozytenkulturen eine Dauer von 10 - 15 Stunden an. Die Replikation ist nach diesen Autoren etwa 3 bis 5 Stunden vor der (mikroskopisch analysierbaren) Metaphase der Kernteilung beendet. Diesen Zeitraum zwischen Replikation und dem Eintritt in die Mitose bezeichnet man als G₂-Phase, die biochemische Aktivitätsphase des Zellkerns zwischen Vollendung der Kernteilung und dem Beginn der Replikation als G₁-Phase. Für die Dauer des gesamten Zellzyklus menschlicher Lymphozyten in Kultur kann man 18 bis 24 Stunden veranschlagen.

In den vorliegenden Tests wurden als Erholungszeiten 6, 12, 18 und 24 Stunden gewählt. Entsprechend den obigen Angaben über die Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen werden also nach 6-stündiger Erholungszeit Zellen in der Metaphase analysiert, die sich zum Zeitpunkt der Agenseinwirkung in der späten S-Phase befanden. Mit 12 Stunden Erholung wird dementsprechend der Anteil der Zellen analysiert, die im ersten Abschnitt der Replikationsphase von Clastogen und Protektor betroffen wurden, mit 18 Stunden Erholung die Zellen in der mittleren bis späten G₁-Phase (= präreplikative Phase), mit 24 Stunden Erholung die Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Agenseinwirkung in der frühen G₁-Phase oder aber in der vorhergehenden Kernteilung befanden.

3.5.2.1) L-Cystein/Trenimon^R

Bei gleichzeitiger Einwirkung von L-Cystein und Trenimon auf die Zellen war das Ausmaß der Schutzwirkung des L-Cystein von der Dauer der Erholungszeit abhängig (Abb. 14 A). Eindeutig signifikant war der Cysteineffekt in den Zellen, die 6, 12 oder 18 Stunden vor der Fixierung behandelt worden waren. ($P = 0,01$). Wie Abb. 14 A erkennen läßt, ist zu diesen Fixierungszeiten der Anteil aberranter Metaphasen (all) deutlich gegenüber den nur mit Trenimon behandelten Kulturen verringert ($RF_{6h} = 0,6$). Besonders auffallend ist die Abnahme des Anteils der Metaphasen,

die mehrere Defekte verschiedenen Typs enthalten (vAT ; $\text{RF}_{\text{oh}} = 0,15$). Dementsprechend ist auch die Anzahl der Achromasien bzw. Bruchereignisse pro ausgewertete Metaphase klar verringert. Mit zunehmendem Abstand der Fixierung von der Agenseinwirkung nimmt das Ausmaß der Protektoreffektes kontinuierlich ab. Wie schon bei den Dosis-Effekt-Untersuchungen zeigte sich auch in diesem Zeit-Test ein verschieden starker Einfluß des L-Cystein auf die Induktion der einzelnen Aberrationstypen durch Trenimon: Die Zahl der Brüche wurde im Durchschnitt deutlicher reduziert als die der Gaps, die der Isochromatidbrüche in stärkerem Ausmaß als die der Chromatidbrüche. Die Zahl Trenimon-induzierter Austauschfiguren war in diesen Versuchen für exakte Aussagen nicht ausreichend groß, ein deutlicher Einfluß des L-Cystein konnte nicht festgestellt werden. Abgesehen von der 6-stündigen Erholungszeit blieb die Zahl Trenimon-induzierter Isochromatid-Gaps ebenfalls von der Cystein-Einwirkung weitgehend unbeeinflußt.

3.5.2.2) AET/Trenimon^R

Die vergleichende Betrachtung der in Abb. 14 B dargestellten Ergebnisse mit den oben erläuterten läßt erkennen, daß der Protektoreffekt des AET eine von dem des L-Cystein grundsätzlich verschiedene Zellzyklus-spezifität aufweist. Während der Anteil aberranter Zellen bei dieser kurzfristigen Einwirkung des AET und des Trenimon in allen erfaßten Zellzyklusphasen praktisch unbeeinflußt bleibt, zeigt sich der stärkste Effekt des AET auf die Zahl der Gaps und Brüche pro ausgewertete Zelle nach 12 Stunden Erholung. Der Anteil der Metaphasen mit Aberrationen verschiedenen Typs wird im Gegensatz zu den bei L-Cystein erhobenen Befunden nur relativ geringfügig reduziert. Die Zahl der Gaps wird vor allem 6 bzw. 12 Stunden vor der Fixierung merklich beeinflußt, während die Zahl der Brüche ganz allgemein vor allem bei einstündiger Agensapplikation 12 Stunden, die der Isochromatid-Brüche im besonderen auch noch bei Agenseinwirkung 18 Stunden vor Fixierung deutlicher reduziert wird.

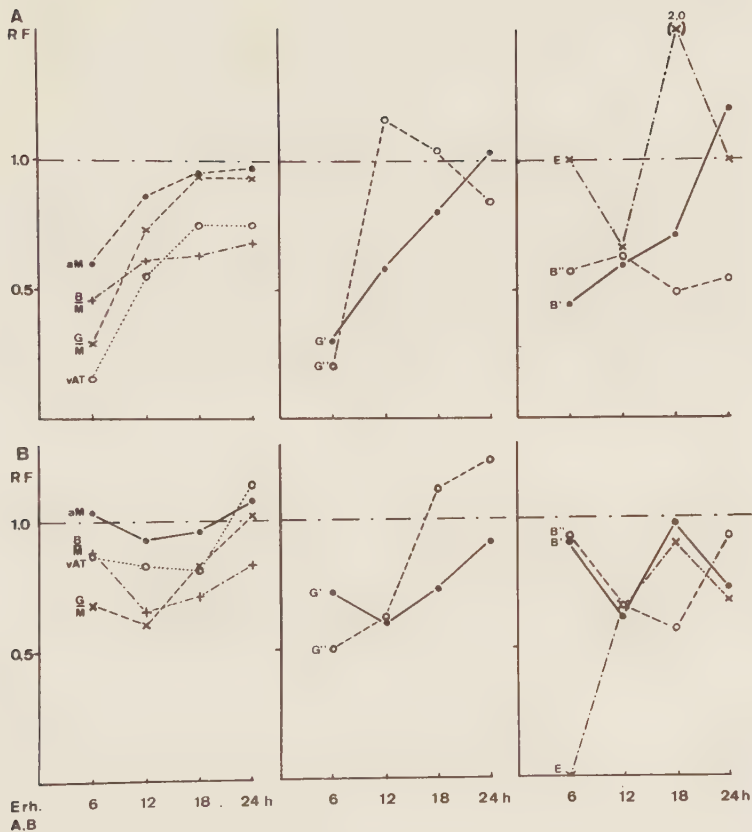


Abb. 14: Der Einfluß von L-Cystein (10^{-4} Mol/l) und AET ($4 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) auf die Aberrationsinduktion durch eine einstündige Einwirkung von Trenimon ($6 \cdot 10^{-7}$ Mol/l) während verschiedener Zellzyklusphasen. (Abszisse: Zeit zwischen 1-stünd. Einwirkung und Fixierung).

A) L-Cystein; B) AET

Erläuterungen der Symbole siehe in Abb. 8.

3.5.2.3) L-Methionin/Trenimon^R

Aus den Aminosäuren wurde L-Methionin für die Kurzzeit-Versuche ausgewählt. Wie Abb. 15 erkennen läßt, zeigt sich auch für L-Methionin eine gewisse Abhängigkeit des Einflusses auf die Trenimon-induzierte Aberrationsrate von der Phase des Zellzyklus, in der die Testagentien appliziert wurden. So war nach Einwirkung dieser Aminosäure in der späten S-Phase (6 Stunden vor Fixierung) eine Zunahme aller untersuchten Aberrationstypen festzustellen. Während bei längeren Erholungszeiten die Zahl der Gaps nur geringfügig beeinflusst wurde, zeigte sich nach 12 und 18 Stunden Erholung eine relativ deutliche Abnahme der Isochromatid-Brüche, deren Ausmaß mit den bei L-Cystein und AET festgestellten Werten vergleichbar war ($RF_{max} : 0,6$).

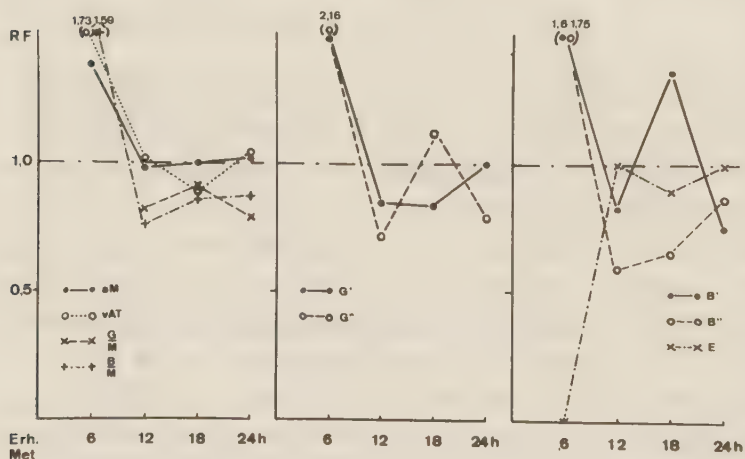


Abb. 15: Der Einfluß von L-Methionin ($4 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) auf die Aberrationsinduktion durch eine einstündige Einwirkung von Trenimon ($6 \cdot 10^{-7}$ Mol/l) während verschiedener Zellzyklusphasen. Weitere Erläuterungen siehe Abb. 8 und 14.

3.5.2.4) L-Cystein/8-HCHS

Zur Überprüfung der mit Trenimon gewonnenen Ergebnisse wurden mit 8-HCHS ergänzende Tests durchgeführt, in die nur zwei Zellzyklusabschnitte einbezogen wurden, in denen dieses Agens bei früheren Untersuchungen eine besonders deutliche chromosomenschädigende Aktivität entfaltet hatte.

Dabei erwies sich das L-Cystein bei gleichzeitiger Einwirkung mit 8-HCHS während des letzten Abschnittes der S-Phase (6 Stunden Erholung) als erheblich aktiver als bei Einwirkung zu Beginn der G1-Phase bzw. während der vorhergehenden Mitose (24 Stunden Erholung). Wie Tabelle 8 zeigt, ging der Anteil aberranter Metaphasen im ersten Fall von 52 % auf 17 % zurück ($P < 0,05$), im zweiten Fall von 37 % auf 24 % ($P < 0,05$). Der reduzierende Einfluß des L-Cystein war bei Gaps und Brüchen in etwa dem gleichen Ausmaß zu erkennen.

Tabelle 8: Protektorwirkung von L-Cystein (10^{-4} Mol/l) gegen die zytogenetische Aktivität von 8-HCHS (10^{-5} Mol/l) bei gleichzeitiger einstündiger Einwirkung in zwei verschiedenen Zellzyklusphasen.

8-HCHS-Einw. (h)	1	1	0	1	1	0	0-Kontr.
Cys.-Einw. (h)	0	1	1	0	1	1	
Erholg. (h)	6	6	6	24	24	24	
Aberr.Metaph. (%)	52	17	6	37	24	10	6
Chromatid-Gaps	44	17	4	17	9	4	1
Isochromatid-Gaps	26	8	0	19	8	4	3
Chromatid-Brüche	18	3	0	12	5	2	1
Isochromatid-Brüche	5	0	2	16	6	2	1
Exchanges	1	0	0	0	0	0	0
Gaps pro Metaph.	0,70	0,25	0,04	0,36	0,17	0,08	0,04
Bruchereign. pro Metaph.	0,25	0,03	0,02	0,28	0,11	0,04	0,02

3.5.3) Nachbehandlung

Zur Klärung der Frage, inwieweit der bei den Dosis-Effekt-Untersuchungen eruierte Protektoreffekt auf eine "Reparatur" bereits induzierter Aberrationen zurückzuführen ist, wurden Tests durchgeführt, bei denen auf eine 1-stündige Clastogen-Einwirkung verschieden lange Nachbehandlungen mit den Test-Protektoren folgte.

3.5.3.1) L-Cystein/Trenimon

Wie Abb. 16 A erkennen läßt, war bei Nachbehandlung Trenimon-behandelter Zellen mit L-Cystein keine sehr deutliche Protektorwirkung der Sulfhydrylverbindung zu erkennen. Den klarsten Effekt erbrachte eine 6-stündige Cystein-Nachbehandlung vor allem bei den Chromatid-Defekten, während die Zahl der Isochromatid-Brüche durch eine 18- bzw. 24-stündige Cystein-Einwirkung nach der Trenimon-Applikation am klarsten reduziert wurde (RF: 0,7). Auch in dieser Versuchsreihe war die Zahl der Austauschfolgen für exakte Aussagen zu gering, so daß die z. T. starke Effektivität der Cystein-Nachbehandlung gegenüber diesem Aberrationstyp lediglich als Hinweis betrachtet werden kann.

3.5.3.2) AET/ Trenimon

Andere Resultate erbrachte die Nachbehandlung mit AET (Abb. 16 B), die sich in einzelnen Fällen als effektiver erwies als die vorher geschilderte gleichzeitige Applikation des AET mit Trenimon. Während der Anteil aberranter Metaphasen unabhängig von der Dauer der AET-Einwirkung nahezu unverändert blieb, zeigte sich eine besonders deutliche Reduktion der Zahl der Zellen mit verschiedenen Aberrationstypen ebenso wie der Bruchereignisse pro Metaphase nach 6- bzw. 24-stündiger Nachbehandlung der Trenimon-geschädigten Zellen mit AET. Die Zahl der Isochromatid-Brüche nahm unter einer 18-stündigen AET Nachbehandlung am deutlichsten ab (RF: 0,6).

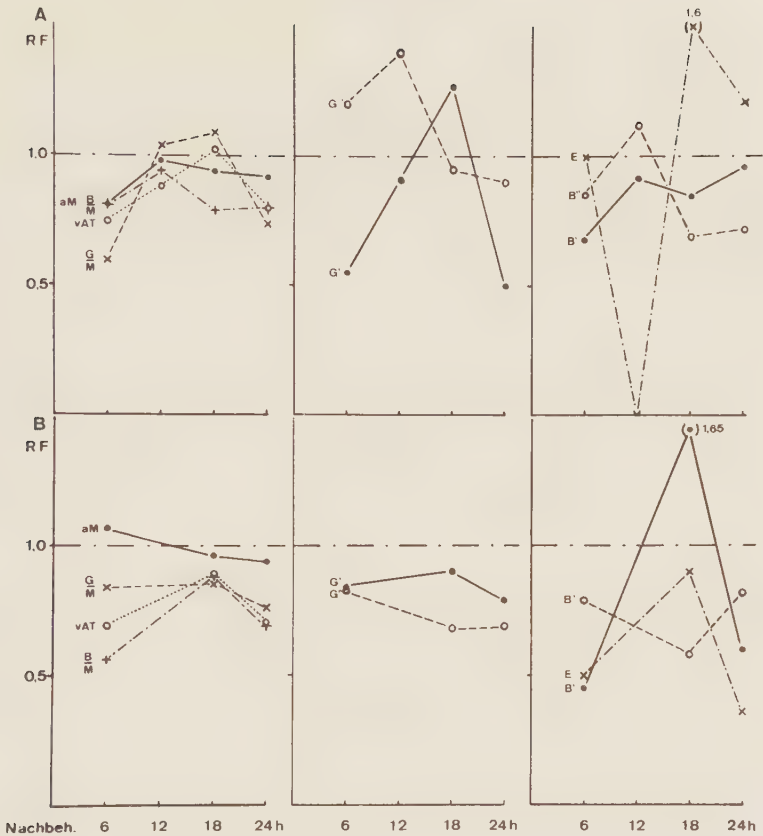


Abb. 10: Der Einfluß einer Nachbehandlung mit L-Cystein (10^{-4} Mol/l) und AET ($4 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) auf die Aberrationsinduktion durch eine einstündige Einwirkung von Trenimon ($6 \cdot 10^{-7}$ Mol/l) während verschiedener Zellzyklusphasen. (Abszisse: Dauer der Nachbehandlung)
Weitere Erläuterungen siehe Abb. 8.

3.5.3.3) L-Cystein/8-HCHS

Wie der Vergleich von Tabelle 9 mit Tabelle 3 erkennen läßt, schützt eine Nachbehandlung mit L-Cystein die Chromosomen vor der aberrationsauslösenden Aktivität des 8-HCHS noch etwas stärker ($P < 0,05$) als die gleichzeitige Einwirkung des Protektors. Insbesondere bei den Gaps ließ sich dieser Effekt klar erkennen.

Tabelle 9: Protektorwirkung einer Nachbehandlung mit L-Cystein (10^{-4} Mol/l) gegen die aberrationsauslösende Effektivität einer einstündigen Behandlung mit 8-HCHS (10^{-5} Mol/l).

8-HCHS-Einw. (h)	1	1	0	1	1	0	0-Kontr.
Cys-Nachbeh. (h)	0	6	6	0	24	24	
Erholg. (h)	6	0	0	24	0	0	
Aberr. Metaph (%)	52	15	7	37	17	12	6
Chromatid-Gaps	44	11	1	17	4	5	1
Isochromatid-Gaps	26	4	2	19	7	1	3
Chromatid-Brüche	18	2	11	12	5	3	1
Isochromatid-Brüche	5	2	3	16	1	4	1
Exchanges	11	0	0	0	1	0	0
Gaps pro Metaph.	0,70	0,15	0,03	0,36	0,11	0,06	0,04
Bruchereign. pro Metaph.	0,25	0,04	0,04	0,28	0,08	0,07	0,02

4) DISKUSSION

4.1) Auswahl der Testsubstanzen und Toxizität

Die Auswahl der Testsubstanzen für Untersuchungen zur Protektorwirkung gegen die clastogene Aktivität chemischer Mutagene muß sich einerseits an der chemischen Struktur und dem cytogenetischen Wirkungsspektrum der einzelnen Agentien, zum anderen aber auch den Grenzen der Toxizität dieser Substanzen im verwendeten Testsystem orientieren. Die für die vorliegende Untersuchung ausgewählten Test-Clastogene waren aus früheren Versuchen als Induktoren chromosomaler Strukturdefekte hinsichtlich ihrer Effektivität und ihres cytogenetischen Wirkungsspektrums gut bekannt (Myleran: GEBHART 1969; RICHMOND u. KAUFMANN 1969. Trenimon: RÖHRBORN 1965, SCHLEIERMACHER 1966; NICOLOFF u. GECHOFF 1968; HAMPEL 1968. β-HCHS: GEBHART 1968).

Die als Test-Protpektoren verwendeten Agentien wurden entweder unter dem Aspekt einer bereits bekannten radioprotektiven Wirkung (L-Cystein, Cysteamin, AET; vgl. BACQ 1965; RIEGER u. MICHAELIS 1967) oder unter dem Gesichtspunkt der chemischen Struktur aus der Gruppe der Aminosäuren ausgewählt. Im Fall der Aminosäuren spielte auch die Überlegung eine Rolle, daß körpereigene und damit relativ gut verträgliche Stoffe als Protektoren gegen die genetische Schädigung von Chemikalien von besonderem Interesse sein dürften (vgl. BARTHELMESS et al. 1968).

Eine toxische Wirkung der Testsubstanzen im untersuchten Konzentrationsbereich wurde durch entsprechende Voruntersuchungen und die damit verbundene Bestimmung des Mitoseindex (= Anteil der in Teilung befindlichen an der Gesamtzahl der vorhandenen Zellen) ausgeschlossen. Vergleiche mit den Angaben in der Literatur über die Grenzen der toxischen Wirkung der hier verwendeten Versuchsagentien in menschlichen Zellkulturen bestätigen die erhobenen Befunde (s. o.).

Insbesondere bezüglich der verwendeten Protektorsubstanzen erscheint es wesentlich, daß z. B. die von JACKSON (1970) in menschlichen Lymphocytenkulturen ermittelten Toleranzgrenzen der toxischen Wirkung von L-Cystein

und Cysteamin um eine bis mehrere Zehnerpotenzen über den Höchstkonzentrationen der vorliegenden Untersuchung lagen.

4.2) Protektoreffektivität

Die zusammenfassende Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse bestätigt die Annahme, daß bestimmte chemische Agentien in der Lage sind, menschliche Chromosomen gegen die aberrationsauslösende (clastogene) Wirkung chemischer Mutagene zu schützen. Als solche "Chemoprotektoren" erwiesen sich in den vorliegenden Untersuchungen die bereits als Schutzstoffe gegen toxische und mutagene Strahlenwirkungen bekannten Agentien L-Cystein, Cysteamin und Aminoäthylisothiuronium (AET) und die Aminosäuren L-Asparagin und (mit gewissen Einschränkungen) L-Methionin. Von den genannten Substanzen war eine Schutzwirkung gegen die mutagene bzw. clastogene Aktivität von Chemikalien bisher nur für L-Cystein nachgewiesen worden, und zwar an pflanzlichem Zellmaterial durch AVANZI (1957, 1961), BONATI u. SAVINO (1965), GEBHART (1968) und KAUL (1969) sowie bei Drosophila durch RÖHRBORN (1968). Für L-Asparagin konnten BARTHELMESS et al. (1968) an Pflanzenzellen einen gewissen Protektoreffekt gegen die clastogene Wirksamkeit von Röntgenstrahlen beobachten.

Für die übrigen untersuchten Aminosäuren (L-Alanin, L-Arginin, L-Glutaminsäure und L-Histidin) konnte in dem hier gewählten Testsystem in den untersuchten Konzentrationsbereichen kein eindeutiger Protektoreffekt nachgewiesen werden. Unter dem Einfluß von L-Alanin, L-Arginin und in geringerem Ausmaß auch von L-Histidin ergab sich sogar eine mehr oder weniger deutliche Verstärkung des Clastogen-Effektes. Dabei fiel besonders die z. T. recht drastische Zunahme Trenimon-induzierter Chromatid-Translokationen auf. VIG et al. (1968) berichten über einen ähnlichen aberrationsfördernden Einfluß des L-Arginin in menschlichen Lymphocytenkulturen bei Verwendung von Daunomycin (Rubidomycin) als Aberrationsinduktor.

Wie die vorliegenden Untersuchungen gezeigt haben, ist die beobachtete Schutzwirkung der Chemoprotektoren in keinem Fall ein absoluter, sondern ein relativer Effekt. Sie ist zudem grundsätzlich an einen deutlichen Überschuß des Protektors gegenüber dem Aberrationsinduktor gebunden. Die Notwendigkeit eines Cystein-Überschusses für die volle Entfaltung des Protektoreffektes zeigten auch schon frühere Untersuchungen an pflanzlichem Zellmaterial (GEBHART 1968; KAUL 1969) und an *Drosophila* (RÖHRBORN 1968).

Die Voruntersuchungen mit Myleran als Test-Clastogen ließen einen recht deutlichen Protektoreffekt von L-Cystein gegen die clastogene Wirkung des Alkylans erkennen, dessen Ausmaß das der Schutzwirkung gegen Trenimon bei weitem übertraf. Die immunsuppressive Aktivität des Myleran, die ebenfalls als Folge der alkylierenden Eigenschaften angesehen wird, wird dagegen nach Untersuchungen von ADDISON und BERENBAUM (1971) durch L-Cystein deutlich gefördert.

Wie aus Tabelle 10 hervorgeht unterscheiden sich die einzelnen Chemoprotektoren in ihrer relativen Effektivität und in ihrem Wirkungsspektrum deutlich voneinander.

Als effektivster Protektor gegen die clastogene Wirkung des trifunktionellen alkylierenden Agens Trenimon erwies sich - unabhängig von der applizierten Dosis - das AET. Bei Anwendung der Schutzstoffe in der Höchstkonzentration ($4 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) ließ sich folgende Reihenfolge der Effektivität erstellen: AET > L-Cystein > Cysteamin > L-Methionin > L-Asparagin. Bei Applikation geringerer Protektormengen ließen sich ganz allgemein eine Abnahme des Ausmaßes der Schutzwirkung sowie Verschiebungen in der Effektivitäts-Skala beobachten. So ergab sich bei einer Schutzstoff-Konzentration von 10^{-4} Mol/l folgende Reihenfolge: AET = L-Methionin > L-Asparagin > Cysteamin > L-Cystein.

In Hinblick auf die noch zu diskutierenden Wirkungsmechanismen des Protektoreffektes erscheint es bemerkenswert, daß sich bei Verwendung

Tabelle 10: Vergleich der Effektivität und des Wirkungsspektrums der Testsubstanzen mit Protektorwirkung bei gleichzeitiger Einwirkung von Protektor und Clastogen über 24 Stunden.

Test-Clastogen:	Trenimon ($2,5 \cdot 10^{-7}$ Mol/l)					3-HCHS ($7,5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l)			
Aberrationstyp	G	B	E	A'	A''	G	B	A'	A''
<u>Protektor</u>									
<u>A) $4 \cdot 10^{-4}$ Mol/l</u>									
L-Cystein	+	+++	+++	++	++	++++	+++	++++	+++
Cysteamin	++	++	-	++	++	+++	++	+++	++
AET	+++	+++	++	+	++++	(+)	+++	(+)	+++
L-Asparagin	-	++	+	+	(+)	++	(+)	++	++
L-Methionin	++	++	-	+	++				
<u>B) 10^{-4} Mol/l</u>									
L-Cystein	-	++	(+)	(+)	(+)	+++	++	+++	++
Cysteamin	(+)	+	+	(+)	+	+++	+++	++	+++
AET	++	++	-	++	++	++	+	-	+++
L-Asparagin	-	++	-	+	+	++	+++	++	+++
L-Methionin	++	++	-	++	++	-	(+)	-	++
L-Glutaminsäure	+	-	-	-	-	(+)	++	-	++

G = Gaps	- = RF > 0,9
B = Brüche	(+) = RF > 0,8
E = Exchanges (Austauschfolgen)	+
A' = Chromatid-Aberrationen	++ = RF > 0,5
A'' = Isochromatid-Aberrationen	+++ = RF > 0,3
	++++ = RF < 0,3

von 8-HCHS als Modell-Clastogen deutliche Unterschiede im Muster der Wirksamkeit der einzelnen Schutzstoffe gegenüber den mit Trenimon erhobenen Befunden ergeben.

Bei einer Protektorkonzentration von $4 \cdot 10^{-4}$ Mol/l entfaltete hier das L-Cystein den umfassendsten Schutzeffekt, dann folgten (in der Reihenfolge der Effektivität) Cysteamin, AET und L-Asparagin. In der Standard-Konzentration der Screening-Tests (10^{-4} Mol/l) war dagegen Cysteamin geringfügig effektiver als L-Cystein und L-Asparagin, dann folgten AET und L-Glutaminsäure. Als schwächster Protektor gegenüber der clastogenen Wirkung von 8-HCHS erwies sich in dieser Testreihe das L-Methionin.

Von großer Bedeutung für vergleichende Aussagen über die relative Effektivität der einzelnen Chemoprotektoren sind Betrachtungen zur Zellzyklusspezifität der Schutzwirkung. Wie Tabelle 11 erkennen läßt, ergeben sich hier ganz gravierende Unterschiede im Muster der Wirksamkeit in Abhängigkeit von der Phase des Zellzyklus, während der Clastogen und Protektor einwirkten. L-Cystein erwies sich in diesen "Kurzzeit-Tests" insgesamt als der effektivste Schutzstoff, wobei es die eindeutigste Wirkung offensichtlich während der gesamten Replikationsphase entfaltet. Bei Untersuchungen an pflanzlichem Zellmaterial über die Protektorwirkung von L-Cystein und Cysteamin gegen die zytogenetische Schädigung von Röntgenstrahlen stellten MIKAELSEN und PEDERSEN (1966) eine ähnliche Zellzyklus-Abhängigkeit des Schutzeffektes fest. Dabei schien L-Cystein bei Bestrahlung während der gesamten Interphase wirksam zu sein, während für Cysteamin nur bei Bestrahlung in der G1-Phase ein deutlicher Effekt nachzuweisen war. Auch YANG und HAHN (1968) sowie YU und SINCLAIR (1970) konnten ein unterschiedliches Ausmaß der Schutzwirkung von Cysteamin gegen die clastogene Wirkung von Röntgenstrahlen an Zellen des Chinesischen Hamsters in Abhängigkeit von der betroffenen Zellzyklusphase beobachten.

Tabelle 11: Vergleich der Effektivität und des Wirkungsspektrums der Protektoren in verschiedenen Zellzyklusphasen mit Trenimon als Modell-Clastogen

Aberrationstyp:	G	B	E	A'	A''
Beh. Erholg (h) 1/6					
L-Cystein	++++	+++		+++	+++
AET	++	-		(+)	+
L-Methionin	-	-		-	-
1/12					
L-Cystein	(+)	++	++	++	(+)
AET	++	++	++	++	++
L-Methionin	+	+	-	+	++
1/18					
L-Cystein	-	++	-	÷	÷
AET	-	+	-	(+)	(+)
L-Methionin	-	-	-	-	(+)
1/24					
L-Cystein	-	(+)	-	-	++
AET	-	(+)	++	(+)	-
L-Methionin	(+)	(+)	-	(+)	(+)

AET bewirkt in der späten S-Phase (Replikationsphase) lediglich eine merkliche Abnahme der Trenimon-induzierten Gaps, während es in der frühen S-Phase eine deutliche Schutzwirkung gegen alle Defekttypen entfaltet. Eine ganz entsprechende Zellzyklus-Abhängigkeit des AET-Effektes konnte BARKAN (1970) bei Bestrahlung von Epithelzellen des kleinen Intestinums der Maus beobachten.

L-Methionin ist bei Applikation 6 Stunden vor der Fixierung (= späte S-Phase) völlig unwirksam, ebenso bei Applikation in der G1-Phase. Dagegen entfaltet es bei Einwirkung während der frühen Replikationsphase und der frühen G1-Phase bzw. der vorausgehenden Kernteilung eine schwache Protektoraktivität.

Unterzieht man die Wirksamkeit der Test-Protektoren gegenüber den verschiedenen Aberrationstypen einer genaueren Analyse, so ergibt sich ein durchaus unterschiedliches Wirkungsspektrum der einzelnen Schutzstoffe. So werden z. B. Trenimon-induzierte Gaps durch L-Cystein in erheblich geringerem Ausmaß verhindert als die durch das gleiche Clastogen ausgelösten Brüche (vgl. Tab. 10). Auch L-Asparagin läßt keinen Einfluß auf die Gaps erkennen, während durch AET Achromasien und Brüche etwa in gleichem Ausmaß vermindert werden. Auch gegenüber Chromatid- und Isochromatid-Aberrationen scheinen die einzelnen Protektoren eine unterschiedlich starke Aktivität zu entfalten. So werden die Trenimon-induzierten Chromatid- und Isochromatid-Aberrationen unter dem Einfluß von L-Cystein etwa im gleichen Ausmaß vermindert. Gegenüber den durch 8-HCHS ausgelösten Chromatiddefekten scheint L-Cystein dagegen wirksamer zu sein als gegenüber den durch das gleiche Clastogen induzierten Isochromatid-Aberrationen. Dagegen reduziert AET unabhängig vom verwendeten Clastogen bevorzugt die Zahl der Isochromatiddefekte. RILEY (1957) beobachtete eine unterschiedlich starke Schutzwirkung des L-Cystein gegen Chromatid- und Isochromatid-Aberrationen nach Röntgenbestrahlung von pflanzlichen Zellen.

Wie Tabelle 10 und das oben genannte Beispiel der Cysteinaktivität erkennen lassen, ist das Protektor-Wirkungsspektrum ebenso wie das Ausmaß der Effektivität auch von dem zur Aberrationsauslösung verwendeten Clastogen abhängig. So erweist sich L-Cystein als hoch-aktiver Inhibitor der Gap-Induktion durch 8-HCHS, während seine entsprechende Wirksamkeit gegenüber Trenimon relativ schwach ist. Ein genau umgekehrtes Verhalten zeigt AET in der Höchstkonzentration. Auch die Kurzzeit-Tests bestätigen eindrucksvoll die unterschiedliche Effektivität der einzelnen Protektoren gegenüber den verschiedenen Aberrationstypen (vgl. Tab. 11).

4.3) Wirkungsmechanismen

Aus dem eben diskutierten Effektivitätsmuster und dem Wirkungsspektrum der untersuchten Chemoprotektoren lassen sich bereits einige Hinweise auf die Mechanismen des Schutzeffektes ableiten. Wesentlich erscheint dabei die Feststellung, daß der Überschuß des Protektors gegenüber dem Test-Clastogen eine bedeutende Rolle spielt. Die Protektoren induzierten ganz allgemein in einem Überschuß von zwei bis drei Zehnerpotenzen niemals einen absoluten Effekt, also eine Reduktion der Aberrationsrate auf das Niveau unbehandelter Kontrollen. Darum läßt sich mit ziemlicher Sicherheit ausschließen, daß eine direkte Reaktion der verwendeten Schutzstoffe mit den aberrationsauslösenden Agentien bereits in der Versuchslösung eintritt. Bei der beobachteten Protektorwirkung handelt es sich also zweifellos um einen bzw. eine ganze Reihe intrazellulärer Prozesse.

Die unterschiedliche Effektivität und vor allem das unterschiedliche Wirkungsspektrum der einzelnen Schutzstoffe gegenüber ein und demselben Clastogen läßt die Annahme einer aus mehreren, z. T. voneinander unabhängigen Komponenten zusammengesetzten Aktivität als gerechtfertigt erscheinen. Sie steht sicherlich in mehr oder weniger direkter Beziehung zum Wirkungsmechanismus des jeweils applizierten Test-Clastogens. Die unterschiedliche Wirksamkeit einzelner Protektoren

gegenüber Trenimon, Myleran und 8-HCHS muß ebenfalls als wichtiger Hinweis auf eine solche direkte Beziehung der Schutzstoffaktivität zum Wirkungsmechanismus des Aberrationsinduktors gewertet werden. Der Protektoreffekt nimmt im allgemeinen nicht linear mit der applizierten Protektordosis zu, sondern strebt meist einem Sättigungswert zu. Dies dürfte die Annahme mehrerer, durch den jeweiligen Protektor in unterschiedlich starkem Ausmaß beeinflubarer Komponenten der Clastogen-Aktivität stützen. Eine weitere Bestätigung dafür ist auch aus dem Vergleich der Effektivität einer Nachbehandlung mit L-Cystein bzw. AET nach einstündiger Trenimoneinwirkung zu ziehen.

Wenngleich es nicht Sinn dieser Untersuchung sein kann, umfangreiche Spekulationen über die biochemischen Wirkungsmechanismen anzustellen, die dem beobachteten anti-clastogenen Effekt zugrunde liegen könnten, erscheinen einige biochemische Grundüberlegungen zum Verständnis des Protektoreffektes doch unerlässlich.

Die biochemische Wirksamkeit des trifunktionellen Äthyleniminderivates Trenimon und des bifunktionellen Myleran ist durch die alkylierenden Eigenschaften dieser beiden Agentien gekennzeichnet. Damit dürften Alkylierungen am Nucleoprotein als wesentlichste Reaktionen der beiden Testsubstanzen hinsichtlich ihrer cytogenetischen Aktivität zu betrachten sein (vgl. RÖHRBORN 1970).

Für Trenimon ist darüber hinaus eine deutliche Hemmung der Glykolyse und als deren Folge eine Erniedrigung des ATP-Spiegels bekannt. Als Ursache der Glykolysehemmung ist mit großer Wahrscheinlichkeit die Abnahme des NAD in der Zelle anzunehmen (Trenimon-Prospekt, BAYER). Wie GRUNICKE (1971) an Ehrlich-Aszites-Tumorzellen feststellte, bewirkt Trenimon sowohl eine Hemmung der NAD-Synthese wie auch eine Beschleunigung des NAD-Abbaues. Der gleiche Autor schließt aus seinen Untersuchungen über die Matrizenaktivität des Chromatins im RNS-Polymerase-System auch auf eine "Modifikation des Nucleoprotein-Komplexes".

Im Gegensatz zu anderen bi- und trifunktionellen Alkylantien ist Myleran nicht in der Lage, "cross-links" in der DNS zu bilden (VERLY u. BRAKIER 1969), so daß es als monofunktionelles Alkylans wirkt. Die Reaktion mit Thiol-Gruppen wird als einer der wichtigsten Reaktionswege des Myleran in der Zelle betrachtet (ROBERTS u. WARWICK 1961). Möglicherweise erklären diese Eigenschaften die auffallenden Unterschiede in der Protektoreffektivität von L-Cystein gegenüber Myleran und Trenimon.

Über die der cytogenetischen Wirksamkeit des 8-MCHS zugrunde liegenden biochemischen Wirkungsmechanismen ist noch relativ wenig bekannt. Hier bietet zweifellos die chelatbildende Wirkung des Agens einen wesentlichen Ansatzpunkt für alle Betrachtungen hinsichtlich seiner intrazellulären biochemischen Aktivität (GEBHART 1969).

Über die biochemischen Wirkungsmechanismen der getesteten Radioprotektoren liegt aus strahlenbiologischen Untersuchungen eine umfangreiche Literatur vor (vgl. Übersichten bei BACQ 1965; BACQ u. ALEXANDER 1966; RIEGER u. MICHAELIS 1967; DERTINGER u. JUNG 1969; STREFFER 1969). Nur in seltenen Fällen bezogen sich solche biochemischen Überlegungen aber bisher auf die Schutzwirkung gegen chemische Mutagene. Angesichts der großen Bedeutung von Sulfhydryl-Gruppen in sämtlichen Zellstrukturen und im Zellstoffwechsel werden zweifellos die SH-Gruppen als entscheidende Reaktionspunkte der Radioprotektoren auch gegenüber der Wirkung von chemischen Mutagenen angesehen werden müssen. In diesem Zusammenhang erscheint der Hinweis wichtig, daß auch das AET durch eine Intratransguanylierung in wäßrigem Milieu zu Mercaptoäthylguanidin (MEG) umgewandelt wird, das dann ebenfalls eine endständige SH-Gruppe trägt und als der eigentlich aktive Protektor betrachtet werden muß (DOHERTY et al. 1957). Daß auch die Aminogruppen dieser Substanzen zumindest für den Schutzeffekt gegen ionisierende Strahlen von großer Bedeutung sind, erscheint gesichert (LANGENDORFF u. KOCH 1956; LANGENDORFF et al. 1956; PANY 1957).

Inwieweit der Protektoreffekt des L-Asparagin unter Umständen mit der Bedeutung der L-Asparaginsäure für die Synthese der DNS- Precursors erklärt werden kann, erscheint noch unsicher. Auch für die Protektoraktivität des L-Methionin läßt sich kein einzelner spezifischer Reaktionsweg angeben. Es erscheint jedoch naheliegend, die der Protektorwirkung zugrundeliegenden biochemischen Vorgänge auch im Fall der genannten Aminosäuren in einen engen Zusammenhang mit den für die Test-Clastogene aufgezeigten biochemischen Aktivitäten zu bringen.

Die Tatsache, daß bei gleichzeitiger Einwirkung von Protektor und Clastogen meist der deutlichste Schutzeffekt zu beobachten war, scheint darauf hinzuweisen, daß die einzelnen Protektoren in verschieden starkem Ausmaß direkt in den Aberrationsauslösungsprozeß einzugreifen vermögen. Dies ist aber, wie bereits dargestellt, sicher nicht die einzige denkbare Komponente des Schutzeffektes. Prinzipiell ist selbstverständlich auch eine kompetitive Aktivität der untersuchten Protektoren bezüglich der übrigen Angriffspunkte der Clastogene in der Zelle nicht auszuschließen. Freilich wäre auch an eine Substitution Clastogen-zerstörter Strukturen durch reaktive Gruppen der Protektoren oder die Protektoren selbst (letzteres zumindest, soweit es sich um Aminosäuren handelt) zu denken. Die Annahme einer prophylaktischen Stabilisierung der cytogenetisch relevanten Strukturen erscheint durch das Fehlen eines Effektes der Vorbehandlung mit dem Protektor nicht bestätigt.

In welchem Ausmaß die Aktivierung von Restitutions- bzw. Repairprozessen durch die Schutzstoffe zur Erklärung der Protektoreffekte herangezogen werden kann, läßt sich bisher nicht eindeutig entscheiden. In den durchgeführten Testserien wurde die Anzahl der Trenimon-induzierten Austauschfolgen durch L-Cystein weniger beeinflußt als die der offenen Brüche. Durch Cysteamin, AET, L-Asparagin und L-Methionin wird die Translokationsbereitschaft sogar erhöht. Dies alles könnte auf eine Förderung der Reunion offener Bruchstellen

unter dem Einfluß der genannten Agentien hinweisen. Damit könnte unter Umständen auch eine verstärkte Restitution von Brüchen "ad integrum" (mikroskopisch!) angenommen werden. Allerdings sind die Zahlen der beobachteten Austauschfolgen möglicherweise nicht groß genug, um die Vorspiegelung eines echten Effektes durch zu große Schwankungsbreiten völlig auszuschließen. Die Gleichförmigkeit der translokationsfördernden Wirkung bei nahezu allen Test-Protektoren und in einer so großen Zahl von Versuchen spricht jedoch eher für echte Erhöhung der Reunionsneigung offener Bruchstellen.

4.4) Schlußfolgerungen

Die Gefährdung des menschlichen Erbgutes (und damit der Erbgesundheit künftiger Generationen) durch bestimmte "Umwelt-Chemikalien" ist heute zu einer unbestreitbaren Tatsache geworden. Cytogenetische Untersuchungen am Säuger und nicht zuletzt an menschlichem Zellmaterial haben ganz wesentlich zur Erweiterung, Sicherung und kritischen Wertung unserer diesbezüglichen Kenntnisse beigetragen.

Eine völlige Ausschaltung dieser Gefahren durch eine Eliminierung aller potentiell erbgutschädigenden Substanzen aus unserer Umwelt erscheint aus rein praktischen Gründen (therapeutische Notwendigkeit; ernährungspolitische Überlegungen) unmöglich. Daher war es notwendig, nach Schutzmöglichkeiten gegen die unerwünschten Nebenwirkungen mutagener Chemikalien zu suchen. Die prinzipielle Möglichkeit eines solchen Schutzes wurde mit den vorliegenden Untersuchungen erstmals an menschlichem Zellmaterial (Lymphocyten in Kultur) aufgezeigt. In einer Zeit, da die unkontrollierte Umweltverschmutzung durch Chemikalien zu einem vorrangigen Problem aller hochzivilisierten Nationen geworden ist und in der der Arzneimittelkonsum nur mehr in Tonnen angegeben werden kann, stehen die Notwendigkeit der raschen Entwicklung und die praktische Bedeutung prophylaktisch oder therapeutisch einsetzbarer Chemoprotektoren außer Zweifel. Die vorliegenden cytogenetischen Modelluntersuchungen stellen

erst den Beginn einer notwendigen Entwicklung dar, die uns letzten Endes zu praktisch anwendbaren "Ideal-Protektoren" führen sollte, die hohe Effektivität und ein möglichst breites genetisches Wirkungsspektrum mit guter Verträglichkeit verbinden müßten.

In der chemischen Struktur solcher effektiver Schutzstoffe gegen die clastogene Aktivität chemischer Mutagene dürften SH-Gruppen sicherlich eine sehr wesentliche Rolle spielen. Die Untersuchungen von BACH und JOHNSON (1971) über die Schutzwirkung von Polyaminen lassen auch die Aminogruppen als wichtigen Bestandteil praktisch anwendbarer Protektoren erscheinen. Die Frage, inwieweit sich die Wirksamkeit der hier untersuchten Protektoren in Gemischen verschiedener Zusammensetzung addieren oder gar potenzieren läßt, bedarf noch umfangreicher Untersuchungen. Zudem muß an geeigneten in-vivo-Testsystemen nicht nur die Effektivität der bereits bekannten oder auch neusynthetisierter Protektoren und Schutzstoffgemische gegen clastogene bzw. mutagene Wirkung geprüft werden, auch die Verträglichkeit dieser Substanzen bleibt noch an geeigneten Testorganismen eingehend zu untersuchen. Eine enge Zusammenarbeit zwischen Biochemikern, Genetikern und Klinikern bietet die einzige Möglichkeit zu entscheidenden Fortschritten auf dem Gebiet der "Chemoprotektion". Die bereits vorliegenden klinischen Erfahrungen mit SH-Verbindungen (insbesondere mit L-Cystein und Acetylhomocystein-thiolakton = Reducdyn) als Strahlenschutzsubstanzen (vgl. Übersicht bei BACKER) sollten als Ermutigung zu weiteren eingehenden Untersuchungen auf diesem Forschungsgebiet betrachtet werden.

5) ZUSAMMENFASSUNG

Die Radioprotektoren L-Cystein, Cysteamin und Aminoäthylisothionium (AET) sowie die Aminosäuren L-Alanin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Glutaminsäure, L-Histidin und L-Methionin wurden auf ihre Schutzwirkung gegen die chromosomenaberrationsauslösende (= clastogene) Aktivität chemischer Mutagene an menschlichen Lymphocytenkulturen untersucht. Als Test-Aberrationsinduktoren (Test-Clastogene) wurden Myleran^R für Vorversuche, sowie Trenimon^R und 8-Hydroxychinolinsulfat für alle systematischen Untersuchungen verwendet.

Von den gewählten Testsubstanzen zeigten die drei Radioprotektoren sowie L-Asparagin einen eindeutigen Schutzeffekt gegen die aberrationsauslösende Wirkung aller Test-Clastogene. L-Methionin ließ eine deutliche Wirksamkeit nur gegenüber Trenimon, L-Glutaminsäure einen schwachen Effekt nur gegenüber 8-Hydroxychinolinsulfat erkennen. Die Aminosäuren L-Alanin, L-Arginin und in geringerem Ausmaß auch L-Histidin zeigten eine aberrationsfördernde Wirkung bei Vorversuchen mit Trenimon als Test-Clastogen, eine eindeutige Wirksamkeit dieser Aminosäuren gegenüber 8-Hydroxychinolinsulfat ließ sich nicht beobachten.

Generell war festzustellen, daß die Protektorsubstanzen zur Entfaltung einer deutlichen Schutzwirkung in starkem Überschuß vorhanden sein mußten (wobei allerdings nie toxische Konzentrationsbereiche erreicht wurden). Am wirkungsvollsten zeigte sich die gleichzeitige Applikation mit dem Test-Clastogen. Die Schutzwirkung war in keinem Fall absolut.

Die Protektoreffektivität der einzelnen Schutzstoffe ist nur beschränkt dosisabhängig, da sie meist einem Grenzbereich zustrebt, in dem eine weitere Zunahme der Schutzwirkung auch durch drastische

Erhöhung der Protektorkonzentration nur mehr in geringfügigem Ausmaß zu erreichen ist. Die daraufhin untersuchten Test-Protektoren zeigten auch eine unterschiedliche Effektivität in Abhängigkeit von der Phase des Zellzyklus, in der sie auf die Chromosomen einwirkten. Nachbehandlung mit den Schutzstoffen unmittelbar nach Entfernung des Test-Clastogens aus der Kultur erwies sich auch hier meist (Ausnahme: AET) als erheblich weniger wirksam als die gleichzeitige Applikation von Protektor und Clastogen. Eine längere Vorbehandlung mit L-Cystein vermochte die Aberrationsauslösung durch Trenimon nicht zu beeinflussen.

Protektoreffektivität, cytogenetisches Wirkungsspektrum und Zellzyklusspezifität waren nicht nur von der verwendeten Protektorsubstanz abhängig, sondern auch vom applizierten Test-Clastogen.

Die aus dieser ersten systematischen Untersuchung an menschlichem Zellmaterial über anticlastogene Wirkung gewonnenen Ergebnisse werden unter den Aspekten der Toxizitätsgrenzen, des Ausmaßes und der Beeinflußbarkeit der Schutzwirkung und der cytogenetischen und biochemischen Wirkungsmechanismen diskutiert.

Eine Anwendung von Chemoprotektoren in der Praxis erscheint in absehbarer Zeit durchaus möglich und gerechtfertigt. Vorher sind allerdings noch umfangreiche systematische Untersuchungen zur "idealen" chemischen Struktur praktisch einsetzbarer Protektoren, zur anticlastogenen und anti-mutagenen Wirksamkeit an anderen Testsystemen, sowie zur "Verträglichkeit" beim Menschen unbedingt erforderlich.

6) LITERATUR

- ADDISON, I.E. u. M.C. BERENBAUM: The effect of cysteine on the immuno-suppressive activity of Busulphan, Cyclophosphamide and Nitrogen Mustard.
Brit. J. Cancer 25 (1971) 172 - 181
- AVANZI, S.: Inibizione dell' effetto citologico dell' acetato di Tallio per mezzo della cisteina.
Caryologia 10 (1957) 96 - 101
- AVANZI, S.: Chromosome breakage by pyrrolizidine alkaloids and modification of the effect with cysteine.
Caryologia 14 (1961) 251 - 261
- BACH, M.K. u. H.G. JOHNSON: Some studies on the antimutagenic action of Polyamines. In: F.E. HAHN (Hrsg.): Progress in Molecular and Subcellular Biology (2)
Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1971
- BACKER, I.: Einige Aspekte zum medikamentösen Strahlenschutz mit Sulphydrylverbindungen.
Mat. Med. Nordm., Wiss. Beibl. Nr. 42
- BACQ, Z.M.: Chemical protection against ionizing radiation.
Thomas, Springfield (Ill.) 1965
- BACQ, Z.M. u. P. ALEXANDER: Fundamentals of radiobiology.
Pergamon Press, Oxford 1966
- BARKAN, R.S.: On the radioprotective effect of AET on the small intestine epithelium of irradiated mice II). The cell protector effect at different stages of the mitotic cycle.
Tsitologiya 12 (1970) 127 - 129
- BARTHELEMESS, A., HUBER, H. u. H. FÜRST: Zytogenetische Untersuchungen über natürliche antimutagene Schutzstoffe für Strahlendiagnose, Strahlentherapie und berufliche Strahlenbelastung.
Strahlentherapie 136 (1968) 116 - 130

BAYER: Trenimon-Prospekt (1971)

BECHER, R.: Persönl. Mitt. (1972)

BIANCHI, N.O., u. M.S.A. DE BIANCHI: DNA replication sequence of human chromosomes in blood cultures.
Chromosoma 17 (1965) 273 - 290

BONATI, F., u. G. SAVINO: Thiol compounds as protectors against X-rays and radiomimetic agents.
Progr. biochem. Pharmacol. 1 (1965) 489 - 500

DERTINGER, H., u. H. JUNG: Molekulare Strahlenbiologie.
Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1969

DFG: Methoden zur Mutagenitätsprüfung.
Komm. f. Mutagenitätsfragen, Mitteilung II(1971)

DOHERTY, D.G. BURNETT, W.T. jr. u. R. SHAPIRA: Radiat. Res. 7 (1957) 13;
zit. nach BACU u. ALEXANDER (1966)

FISHBEIN, L., FLAMM, W.G. u. H.L. FALK: Chemical Mutagens.
Academic Press, New York, London 1970

GEBHART, E.: Die Wirkung von L-Cystein auf die chromatidbrechende Aktivität von 8-Hydroxychinolinsulfat.
Protoplasma 65 (1968) 247 - 250

GEBHART, E.: Untersuchungen über die Wirkung von 8-Hydroxychinoliniumsulfat auf menschliche Chromosomen in vitro.
Mutation Res. 6 (1968) 309 - 318

GEBHART, E.: Chromosomenaberrationen durch Myleran in menschlichen Lymphocyten in vitro.
Humangenetik 7 (1969) 126 - 136

GEBHART, E.: The treatment of human chromosomes in vitro: results.
In: VOGEL u. G. RÖHRBORN (Hrsg.): Chemical mutagenesis in mammals and man.
Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1970

- GEBHART, E.: An assay of anti-clastogens.
IVth Intern. Congr. Human Genet., Paris 1971
- GEY, W.: Autoradiographie an menschlichen Chromosomen mit ^3H -Thymidin.
In: Schwarzacher, H.G. u. U. WOLF (Hrsg.):
Methoden in der medizinischen Cytogenetik.
Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1970
- GRUNICKE, H.: Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus alkylierender
Cytostatika.
Mitt.-Dienst Ges. z. Bekämpfung d. Krebskrankh.
5 (1971) Heft 5 (1 - 94)
- HAMPEL, K.E.: Über die Wirkung von Zytostatika auf die Chromosomen des
Menschen.
Int. Z. Klin.Pharmakol. Therap. Toxikol.
1 (1968) 322 - 371
- HOLLAENDER, A. (Hrsg.): Chemical Mutagens. Vol. 1 u. 2, Plenum-Press,
New York, London 1971
- JACKSON, J.F.: Toxicity of sulphhydryl compounds to cultured human
lymphocytes. Exp. Cell. Res. 61(1970) 468-469
- JOHNSON, H.G. u. M.K. BACH: Apparent suppression of mutation rates in
bacteria by spermine.
Nature 208 (1965) 408 - 409
- JOHNSON, H.G. u. M.K. BACH: The antimutagenic action of polyamines:
Suppression of the mutagenic action of an E.coli
mutator gene and of 2-aminopurine.
Proc. Natl. Acad. Sci. 55 (1966) 1453 - 1456
- JOHNSON, H.G. u. M.K. BACH: Apparent antimutagenic activity of quina-
crine hydrochloride in Detroit-98 human sternal
marrow cells grown in culture.
Cancer Res. 29 (1969) 1367 - 1370

KAUL, B.L.: Modification of the radiomimetic effects of nitroso-guanidine by cysteine in plants.
Experientia 25 (1969) 74

LANGENDORFF, H. u. R. KOCH: Untersuchungen Über einen biologischen Strahlenschutz. XIV. Mitt.: Weitere Untersuchungen zur Spezifität der Strahlenschutzwirkung von Cystein-Cysteamin und verwandter Sulfhydrylkörper.
Strahlentherapie 99 (1956) 567 - 576

LANGENDORFF, H., KOCH, R. u. U. HAGEN: Untersuchungen Über einen biologischen Strahlenschutz. XV. Mitteilung: Die fehlende Strahlenschutzwirkung der nicht zur Cystein-Cysteamin-Gruppe gehörigen Sulfhydrylkörper.
Strahlentherapie 100 (1956) 137 - 141

MIKAELSEN, K. u. K. PEDERSEN: Protective effectiveness of cysteine, cysteamine, and cystamine against X-ray induced chromosome aberrations at different stages of mitosis.
Hereditas 60 (1968) 399 - 406

MOORHEAD, P.S., NOWELL, P.C., MELLMANN, W.J., BATTIPS, D.M., HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood.
Exp. Cell. Res. 20 (1960) 613 - 616

NICOLOFF, H. u. K. GECHOFF: Localized breakage by 2, 3, 5-tris-ethyleneimino-1,4-benzoquinone in barley chromosomes.
Mutation Res. 6 (1968) 257 - 261

PANY, J.: Chemischer und biologischer Strahlenschutz.
Wien. klin. Wschr. 69 (1957) 605 - 610

RICHMOND, J.Y. u. B.N. KAUFMANN: Studies on busulfan (myleran) treated leukocyte cultures.
Exp. Cell. Res. 54 (1969) 377 - 380

RIEGER, R. u. A. MICHAELIS: Chromosomenmutationen.
Fischer, Jena 1967

RILEY, H.P.: Chemical protection against X-ray damage to chromosomes.
Genetics 42 (1957) 593 - 600

ROBERTS, J.J. u. G.P. WARWICK: Biochem. Pharmacol. 6 (1961) 217; zit.
nach ADDISON u. BERENBAUM (1971)

RÖHRBORN, G.: Die mutagene Wirkung von Trenimon bei der männlichen Maus.
Humangenetik 1 (1965) 576 - 578

RÖHRBORN, G.: Chemische Konstitution und mutagene Wirkung. IV Zyklische
N-Loxsterivate.
Molec. Gen. Genetics 102 (1968) 50 - 68

RÖHRBORN, G.: Biochemical mechanisms of mutation.
In: Vogel F. u. G. Röhrborn (Hrsg.): Chemical
mutagenesis in mammals and man.
Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1970

SCHLEIERMACHER, E.: Über den Einfluß von Trenimon und Endoxan auf die
Meiose der männlichen Maus. II Cytogenetische
Befunde nach Behandlung mit Trenimon und
Endoxan.
Humangenetik 3 (1966) 134 - 155

SHAW, M.W.: Human chromosome damage by chemical agents.
Ann. Rev. Med. 21 (1970) 409 - 432

STREFFER, C.: Strahlen-Biochemie. Springer, Berlin, Heidelberg, New
York 1969

VERLY, W.G. u. L. BRAKIER: The lethal action of monofunctional and
bifunctional alkylating agents on T7
Coliphage.
Biochim. Biophys. Acta 174 (1969) 674

VIG, B.K., KONTRAS, S.B., PADDOCK, E.F. u. L.D. SAMUELS: Daunomycin-induced chromosomal aberrations and the influence of arginin in modifying the effect of the drug.

Mutation Res. 5 (1963) 279 - 287

VOGEL, F. u. G. RÜHRBORN (Hrsg.): Chemical Mutagenesis in Mammals and Man. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1970

WHO-Report: Evaluation and testing of drugs for mutagenicity: Principles and problems.

WHO, Techn. Rep. Ser. No. 482, Genf 1971

YANG, S.J. u. G.M. HAHN: Cell-cycle-dependent protection by cysteamine against X-ray-induced chromosome aberrations. Int. J. Radiat. Biol. 14 (1968) 71 - 73

YU, C.K., u. W.K. SINCLAIR: Protection by cysteamine against mitotic delay and chromosomal aberrations induced by X-rays in synchronized Chinese Hamster cells. Radiat. Res. 43 (1970) 357 - 371

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990